

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALA-5 ARACILI FOTODİNAMİK TERAPİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN LAZER VE LED IŞIK KAYNAKLI
SİSTEMLER ARACILIĞIYLA İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buşra SÖNMEZOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Dr.Öğr. Üyesi Ayla EREN ÖZDEMİR

Aralık 2020

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALA-5 ARACILI FOTODİNAMİK TERAPİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN LAZER VE LED IŞIK KAYNAKLI
SİSTEMLER ARACILIĞIYLA İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buşra SÖNMEZOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 02/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Ayla
EREN ÖZDEMİR

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mustafa Zahid
Yıldız

Üye

Doç. Dr. Gökçen
ÇETİNEL

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Buşra SÖNMEZOĞLU

16.02.2015

TEŞEKKÜR

Danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayla Eren ÖZDEMİR'e çalışmalarım için gösterdiği destek ve yardımları için teşekkür ederim. Laboratuvar olanaklarını sağlayan, yardım ve desteğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a teşekkür ederim. Değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca danıştığım her konuyu kıymetmetli zamanımı ayırıp sabırla dinleyen, bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını yapan, çekinmeden kapısını çaldığım çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI'ya teşekkür ederim. Lisans ve yüksek lisans yaşamım boyunca maddi ve manevi desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Ar. Gör. Dr. Numan ECZACIOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimi boyunca benimle birlikte her zorluğu yaşamış olan, yaşadığım bu süreç içerisinde desteğini esirgemeyen yol arkadaşım Ebru AKSOY'a teşekkür ederim.

Hayat serüvenine başladığım andan itibaren maddi ve manevi, koşulsuz yanımda olan canım babam Mensur GÜNOĞLU'na, canım annem Nezaket GÜNOĞLU'na ve ailemin diğer üyelerine ayrı ayrı çok teşekkür ederim. İkinci ailem sevgili babam Rahmi SÖNMEZOĞLU'na, annem Nazile SÖNMEZOĞLU'na ve Merve SÖNMEZOĞLU'na teşekkür ederim. Maddi ve manevi desteğini gördüğüm, her anımda yanımda olan, sabırla beni dinleyen ve anlayan hayat arkadaşım, can yoldaşım, biricik eşim Semih SÖNMEZOĞLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmamın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No: 118e235) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Kolorektal Kanser	4
2.1.1. Kolon anatomisi.....	4
2.1.2. Histoloji	6
2.1.3. Fizyoloji	7
2.1.4. Kolorektal kanser epidemiyolojisi.....	8
2.1.5. Kolorektal kanserin moleküler mekanizması	9
2.1.6. Kolorektal kanserin risk faktörleri	11
2.1.7. Kolorektal kanserin tanı ve evrelendirilmesi	13
2.1.8. Kolon kanseri tedavisi	16
2.2. Fotodinamik Terapi.....	21
2.2.1. Fotodinamik terapi tarihçesi	21
2.2.3. Fotodinamik terapi kuamı ve mekanizması	25
2.2.4. Fotodinamik terapi etki mekanizmaları	28
2.2.4.1. Doğrudan hücre ölümü	29
2.2.4.2. Vasküler mekanizmalar	33

2.2.4.3. İmmünojenik mekanizma.....	34
2.3. Fotodinamik Terapide Fotoduyarlı Maddeler	35
2.3.1. Aminolevulinik asit.....	40
2.3.1.1. ALA'nın klinik uygulamaları	45
2.4. Fotodinamik Terapide Kullanılan Işık Kaynakları ve Dalga Boyu	46
2.5. Oksijen.....	50

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	51
3.1. Materyal.....	51
3.2. Yöntem.....	51
3.2.1. Kullanılan araç-gereçler.....	51
3.2.1.1. Sarf malzemeler.....	51
3.2.1.2. Cihazlar	52
3.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler	52
3.2.2.1. Hücre besiyeri	53
3.2.2.2. ALA-5.....	53
3.2.2.3. MTT	53
3.3. Analizler.....	53
3.3.1. Hücrelerin kültüre alınması	53
3.3.2. Tripan mavisi ile hücre sayımı.....	54
3.3.3. Işık kaynakları	55
3.3.4. Optimizasyon çalışmaları	57
3.3.4.1. İlaç dozu uygulaması.....	57
3.3.4.2. Işık dozu uygulaması.....	57
3.3.5. Ana deney çalışması	59
3.3.5.1. Fotodinamik terapi	59
3.3.6. Hücre sitotoksikite deneyleri.....	60
3.3.6.1. MTT yöntemi	60
3.3.6.2. XTT yöntemi	61

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	62
4.1. Hücre canlılığı üzerine ışık bağımlılığı	62
4.2. Hücre canlılığı üzerine ilaç dozu bağımlılığı.....	63
4.3. Ana Deney Çalışması Sonuçları	64

BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ	72
KAYNAKLAR.....	83



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADPM	: Azadipirometan
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ALA-5	: Aminolevulinic asit 5
ALAS	: ALA Sentaz
AlPcCl	: Kloralüminyum Ftalosiyanimler
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APC	: Adenomatöz Polipolizis Coli
Ar	: Argon
ATCC	: American Tip Culture Collection
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BPD	: Benzoporfirin
BT	: Bilgisayar Tomografi
°C	: Santigrat Derece
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CEA	: Karsinembriyonik Antijen
CIMP	: CpG Ada Metilat Fenotipi
CIN	: Kromozomal İstabilite
cm	: santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim A
CW	: Continious Mode
DMEM-HA	: Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucos
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EBRT	: Dış Işın Radyasyon Tedavisi
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EndoG	: Endonükleaz G
ER	: Endoplazmik Retikulum
FAP	: Ailesel Adenomatö Polipoz
FBS	: Fetal Bowine Serum
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FDM	:Fotoduyarlı Madde
FDT	: Fotodinamik Terapi
FWHM	: Full Width Half Maximum
HAL	: Heksil Aminolevulinat
He	: Helyum
HNPCC	: Herediter Non-polipozis Kolorektal Kanser
Hp	: Hematoporfirin
HRM	: Hem Düzenleyici Motif
IARC	: Uluslararası Kanser ajansı
IORTJ	: İntraoperatif Radyasyon
J	: Joule
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinaz
Kr	: Kripton
kW	: kilowatt
LED	: Light emitting diode
MAC	: Mifiye Asit-Coller
MAL	: Metil Aminolevulinat
MHz	: MegaHertz
MIOMP	: Mitokondriyal Dış Zar Permobilizasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Mili Molar
MR	: Manyetik Rezonans
MSI	: Mikrosatelit İnstabilite
m-THPC	: Meta-Tetrahidroksimetan
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mW	: MiliWatt
Nd/YAG	: Neodyum doned Yitrium Alüminyum Garnet

Ne	: Neon
nm	: Nanometre
NSAIDS	: Steroid Olmayan Anti-Inflamatuar İlaçlar
O ₂	: Oksijen
PBS	: Phosphate Buffered Saline
Pc	: Ftalosiyenin
Pen	: Penisilin
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PM	: Pulse Mode
pO ₂	: Oksijen basıncı
PpIX	: Protoforfirin IX
RIP1	: Reseptörlerle Etkileşen Protein 1
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakıkada dönüş
s	: saniye
SPM	: Süper Atım Modu
Strep	: Streptomisin
TEC	: Thermo Electric Cooling
TNF	: Tümör Nekrosis Faktörü
TNM	: Tümör Lenf Nodu Metastaz
UICC	: Kanserele Mücadeleuluslararası Birliği
UV	: Ultraviyole
W	: Watt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kolon anatomisi	5
Şekil 2.2. Bağırsak duvarı katmanları	7
Şekil 2.3. Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi	25
Şekil 2.4. Fotodinamik terapi mekanizması	28
Şekil 2.5. Hücre ölüm şekilleri	33
Şekil 2.6. Fotodinamik terapinin etki mekanizmaları	37
Şekil 2.7. PpIX'un absorpsiyon bantları	41
Şekil 2.8. Fotodinamik terapi için optik pencere ve dokuda soğurulması	47
Şekil 2.9. Görünür ve yakın kızıl ötesi ışık spektrumu, maksimum doku penetrasyonunun dalga boyları, bazı fotoduyarlı maddelerin absorpsiyon dalga boyları	47
Şekil 3.1. Lazer cihaz düzeneği	55
Şekil 3.2. LED cihazı düzeneği	56
Şekil 3.3. Deney düzeneği	58
Şekil 3.4. Deney düzeneği	60
Şekil 4.1. Lazer ve LED için farklı ışık dozlarında HT-29 kolon kanserinin hücre canlılık yüzdeleri	62
Şekil 4.2. Lazer ve LED için farklı ışık dozlarında WI-38 akciğer fibroblastı hücre canlılık yüzdeleri	63
Şekil 4.3. Farklı ALA-5 konsantrasyonlarının MTT hücre canlılık yüzdeleri ..	64
Şekil 4.4. Birinci FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait XTT hücre canlılık yüzdeleri	65
Şekil 4.5. İkinci FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri	66
Şekil 4.6. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları	67

Şekil 4.7. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları	67
Şekil 4.8. Üçüncü FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri	68
Şekil 4.9. Dördüncü FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri	69
Şekil 4.10. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları.....	70
Şekil 4.11. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları.....	71
Şekil 4.12. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda lazer ve LED tabanlı, devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları	72
Şekil 4.13. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda lazer ve LED tabanlı, devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları	72

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. TNM sınıflandırma sistemi	15
Tablo 2.2. TNM sistemi ve kanser evresi arasındaki ilişki	15
Tablo 2.3. Kolorektal kanserde tedavi seçenekleri	19
Tablo 2.4. Kolorektal kanser teavisinin bazı dezavantajları	20
Tablo 2.5. Birinci nesil fotoduyarlı maddeler	37
Tablo 2.6. İkinci nesil fotoduyarlı maddeler	38
Tablo 2.7. Porfirin olmaayan fotoduyarlı maddeler	39
Tablo 2.8. Klinik olarak kabul edilmiş fotoduyarlı maddeler	39
Tablo 2.9. ALA ile yapılmış bazı in vitro çalışmalar	42
Tablo 3.1. Sarf malzemeler	51
Tablo 3.2. Cihazlar	52
Tablo 3.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler	52
Tablo 3.4. Kullanılan fotoduyarlı madde	53
Tablo 3.5. Işık dozları	58
Tablo 3.6. Lazer ve LED için dozlar	59

ÖZET

Anahtar kelimeler: Fotodinamik terapi, kolon kanseri, lazer ışık kaynağı, LED ışık kaynağı, ALA-5

Fotodinamik terapi (FDT), kanser ve bazı malign olmayan hastalıkların tedavisi için klinik olarak onaylanmış bir tedavi türüdür. Fotoduyarlı madde (FDM) adı verilen ışığa duyarlı bir maddenin seçici olarak hedef dokudaki tümörde birikmesi ve bu maddeye uygun dalga boyundaki ışık ile uyarılmasıyla dokuda reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek kanserli hücrenin ölümüne neden olan bir dizi olayları başlatır. Böylelikle sağlıklı dokuda herhangi bir zarar vermeden sadece tümörlü dokuyu tahrip eden bir tedavi türüdür.

FDT etkinliğini fotoduyarlı madde, ışık kaynağı, dalga modu, tümör tipi, tümör boyutu ve yeri gibi parametreler etkilemektedir. FDT’de yaygın olarak lazer ve LED (light emitting diode- ışık yayan diyotlar) kullanılmaktadır. Son yıllarda fotodinamik tedavi sırasında oluşan termal hasarı engellemeye yönelik çeşitli dalga atım modları kullanılmaktadır: devamlı, puls ve süper atım modu.

Bu çalışmada HT-29 kolon kanseri hücre hattında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı 5-aminolevulinik asit (ALA-5) fotoduyarlı maddesi kullanılmıştır. ALA-5 aracılı fotodinamik terapinin HT-29 kolon kanseri hücre hattında etkisi lazer ve LED kaynaklı sistemlerde iki farklı dalga modu kullanılarak incelenmiştir. 635 nm dalga boyunda lazer ve LED kaynakları ile devamlı dalga modu (CW) ve puls dalga modu (PM) kullanılmıştır. HT-29 kolon kanseri hücre hattında uygun ALA-5 dozu ve ışık dozu parametreleri MTT ve XTT analizleri ile belirlenmiştir. 1 mM ALA-5 konsantrasyonu ve $10 J/cm^2$, $15 J/cm^2$ and $20 J/cm^2$ enerji yoğunlukları ile fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak WI-38 akciğer fibroblastı hücre hattında çalışılmıştır. Bu doğrultuda belirlenen etkin ALA-5 konsantrasyonu ve ışık dozu tek başına hücre poliferasyonunu inhibe etmediği görülmüştür. Belirlenen dozlar kullanılarak devamlı ve pulse dalga modları kullanılarak lazer ve LED tabanlı sistemlerde fotodinamik terapi yapılmıştır. Tedaviden 24 saat sonra XTT analizleri yapılarak hücre sitotoksitesi incelenmiştir.

Sonuç olarak her iki sistem ile yapılan fotodinamik terapi sonucu hücre poliferasyonu azalmış ve devamlı dalga modunun daha çok hücre sitotoksitesine neden olduğu görülmüştür.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ALA-5-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY ON COLON CANCER CELL LINE BY USING LASER AND LED LIGHT SOURCE SYSTEMS IN VITRO

SUMMARY

Keywords: Photodynamic therapy, colon cancer, laser light source, LED light source, ALA-5

Photodynamic therapy (FDT) is a clinically approved type of therapy for the treatment of cancer and some non-malignant diseases. By selectively accumulating a light-sensitive substance called photo-sensitive substance (FDM) in the tumor in the target tissue and stimulating it with light at the appropriate wavelength, it produces reactive oxygen species (ROS) in the tissue and initiates a series of events that cause the death of the cancer cell. Thus, it is a type of treatment that destroys only the tumor tissue without any damage to the healthy tissue.

Parameters such as photo-sensitive substance, light source, wave mode, tumor type, tumor size and location affect FDT activity. Laser and LED (light emitting diode - light emitting diodes) are commonly used in FDT. Various wave pulse modes have been used in recent years to prevent thermal damage during photodynamic therapy: continuous, pulse and superbeat modes.

In this study, 5-aminolevulinic acid (ALA-5) photo sensitive substance approved by the US Food and Drug Administration (FDA) was used in HT-29 colon cancer cell line. The effect of ALA-5 mediated photodynamic therapy on HT-29 colon cancer cell line was investigated using two different wave modes in laser and LED-induced systems. Continuous wave mode (CW) and pulse wave mode (PM) are used with 635 nm wavelength laser and LED sources. In HT-29 colon cancer cell line, appropriate ALA-5 dose and light dose parameters were determined by MTT and XTT analyzes. Photodynamic therapy was carried out with 1 mM ALA-5 concentration and energy densities of $10 J/cm^2$, $15 J/cm^2$ and $20 J/cm^2$. As a control, the WI-38 lung fibroblast cell line was studied. Accordingly, it was seen that effective ALA-5 concentration and light dose determined did not inhibit cell proliferation alone. Photodynamic therapy was applied in laser and LED-based systems using the determined doses, using continuous and pulse wave modes. 24 hours after treatment, cell cytotoxicity was investigated by XTT analyzes.

As a result, as a result of photodynamic therapy with both systems, cell proliferation decreased and continuous wave mode caused more cell cytotoxicity.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Vücudumuzun doğal yaşam döngüsü içerisinde hücreler, bölünerek ve farklılaşarak gelişim gösterirler. Nedeni henüz bilinmeyen bir sebepten dolayı hücrelerin geçirdiği bu yaşam döngüsü bozular ve hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünmeye, farklılaşmaya başlayıp çoğalırlar. Kontrolsüz büyüyen çoğalan hücrelerin oluşturduğu bu yapıya kanser denir. Kanseler vücudun herhangi bir yerinde oluşabilirler ve kan ya da lenf dolaşımıyla vücudun başka bir bölgesine gidebilirler. Akciğer, prostat, meme, kalın bağırsak (kolorektal), mide, pankreas kanseri gibi birçok çeşidi vardır.

Kanser çağımızın en büyük hastalığı olmakla birlikte henüz tedavisi tam anlamıyla bulunamamış bir hastalık türüdür. Kanserin epidemiyolojik özellikleri; coğrafi dağılım, cinsiyet, yaş, sosyo ekonomik ve mesleki özelliklere göre farklılık göstermektedir. 2015 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada ölüm nedenlerinin birinci sırasında kanser yer almaktadır. 2012 yılında dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakasının geliştiği ve bu sayısının dünya nüfus artışına ve yaşlanmaya bağlı olarak 20 yılda %70 artacağı öngörülmüştür. Globocan 2012 verilerine göre dünyada erkeklerde üçüncü sırada, kadınlarda ikinci sırada; Kanser Daire Başkanlığı 2015 verilerine göre Türkiye’de erkek ve kadınlarda üçüncü sırada kolorektal kanser görülmektedir [1]. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2018 verilerine göre ise kanser vakalarının %10,2’si kolorektal kansere ait olduğu ve %9,2 ölüm oranına sahip olduğunu göstermişlerdir [2]. Kolorektal kanserin oluşum nedeni tam olarak bilinmese de araştırmalara göre bazı risk faktörleri bu hastalığa yakalanma olasılığını arttırdığını göstermiştir. Yaş alma, kolorektal polipler, kişinin aile öyküsü, genetik değişiklikler, beslenme alışkanlıkları, sigara gibi tütün ürünleri tüketimi, yaşam tarzı vs. gibi risk faktörleri bulunmaktadır. Kolorektal kanserde tedavi yöntemi tümörün yeri ve kanserin evresine bağlı olarak

değişmektedir. Cerrahi yöntemler, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve biyolojik tedavi gibi farklı tedavi seçenekleri uygulanmaktadır [3]. Hastalığın tedavi aşaması zorlu bir süreç olmakla beraber gelenekselleşen bu tedavi yöntemleri hastalarda ciddi yan etki oluşturmakta ve hastaları bu süreçte yıpratmaktadır.

Biyomedikal mühendisliği, canlı organizmayla alakalı olan, tıp ve biyoloji alanlarında oluşan problemleri mühendislik yaklaşımıyla yaklaşarak bu alandaki sorunları çözmeyi amaçlayan multidisipliner bir mühendislik dalıdır. Yenilikçi bir yaklaşım kullanarak özellikle hastalıkların teşhis ve tedavisinde cihaz tasarımları geliştiren; aynı zamanda beyin, kalp, kas gibi biyolojik yapılar tarafından üretilen fizyolojik sinyallerin anlaşılabilmesi için kimya, fizik, bilgisayar yazılımları, matematik modelleri ve istatistiksel hesaplar kullanan bir mühendislik dalıdır. Bu manada klinik anlamda vücut fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması ve hastalıklara tedavi gerçekleştirilmesine imkan sağlamaktadır.

Tıbbın gelişmesinde önemli bir role sahip olan biyomedikal mühendisliğinde yaşanan gelişmeler ve bununla beraber farklı faktörlere bağlı olarak 20. yüzyılda insan ömrü ortalamasının arttığı bilinmektedir. Biyomedikal mühendislerinin geliştirdikleri teknolojilerle birlikte hastalıklarla mücadele etme ve bunun kolaylaşması, maliyeti yüksek olan ilaçların makul seviyelere çekilmesi gibi önemli kazanımlar elde edilmiştir. Yine biyomedikal alanda gerçekleşen yenilikler, hastalıkların erken teşhisi ve biyomedikal sistemlerle cerrahi işlem yapılmasına olanak sağlayan tedavi kısmında da etkin bir rol oynamaktadır. Hastalıkların teşhisi ve tedavisinin yanı sıra biyomalzeme kısmında da gerekli olan ihtiyaçları karşılama konusunda aktif rol oynayarak insanlara kaliteli bir yaşam fırsatı sunmaktadır [4]. Günümüzde teknolojinin bu şekilde ilerlemesiyle beraber, geleneksel tedavi yöntemlerinin dezavantajlarının büyük çoğunluğunu minimize eden bir tedavi yöntemi gelişmektedir. Bu tedavi yöntemlerine alternatif olarak özellikle son yıllarda kanser tedavisinde fotodinamik terapi uygulamaları kullanılmaya başlanmıştır.

Fotodinamik terapi (FDT), apoptoz veya nekrozla hücre ölümünü hedefleyen reaktif oksijen ve/veya serbest oksijen radikalleri üretmek için hafif ve moleküler oksijen

varlığında aktif hale gelen ışığa duyarlı madde kullanan alternatif bir tedavi yöntemidir [5]. FDT, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış bir tedavi türüdür. Bu tedavi yönteminde fotoduyarlı maddenin sistemik veya topikal olarak uygulanmasının ardından fotoduyarlı maddeye uygun dalga boyundaki ışıkla tümörlü doku uyarılır. Daha sonra tümörlü dokudaki oksijen varlığında, doku nekroz, apoptoz ya da otofajiye sürüklenerek ölümü gerçekleşir. Burada yaşanan olayların tümü fotokimyasal olaylar olduğu için sadece tümörlü dokuda sitotoksik etki görülürken bağ dokusu hasarı gerçekleşmez ve bu sayede sağlıklı doku ve organlar zarar görmez. FDA tarafından onaylanmış birçok fotoduyarlı madde bulunmaktadır. Fotoduyarlı maddeler genellikle fotodinamik reaksiyonda uyarılmış uzun ömürlü triplet seviyenin oluşumunda etkili olan aromatik moleküllerdir. Boya, ilaç, kozmetik, kimyasal maddeler ve birçok doğal madde içeren, ışığa duyarlı hale getirme özelliklerinde 400'den fazla bileşik bilinmektedir. En uygun fotoduyarlı madde gereksinimleri foto-fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri içerir. İdeal bir fotoduyarlı madde toksik olmamalı ve sadece ışınlanma ile etkinleştirildikten sonra lokal toksisite göstermelidir [6]. Tümörün bulunduğu yere ve tedavi şekline uygun fotoduyarlı maddeler kullanılmaktadır. Hematoporfirin, fotofrin (porfimer sodyum), aminolevulinik asit, protoporfirin IX, verteporfin, foscan, temoporfin, 8-metoksipsoralen, ftalosiyenin, metilen mavisi, indosiyenin yeşil, hiperisin gibi fotoduyarlı maddeler kullanılmaktadır [7-11].

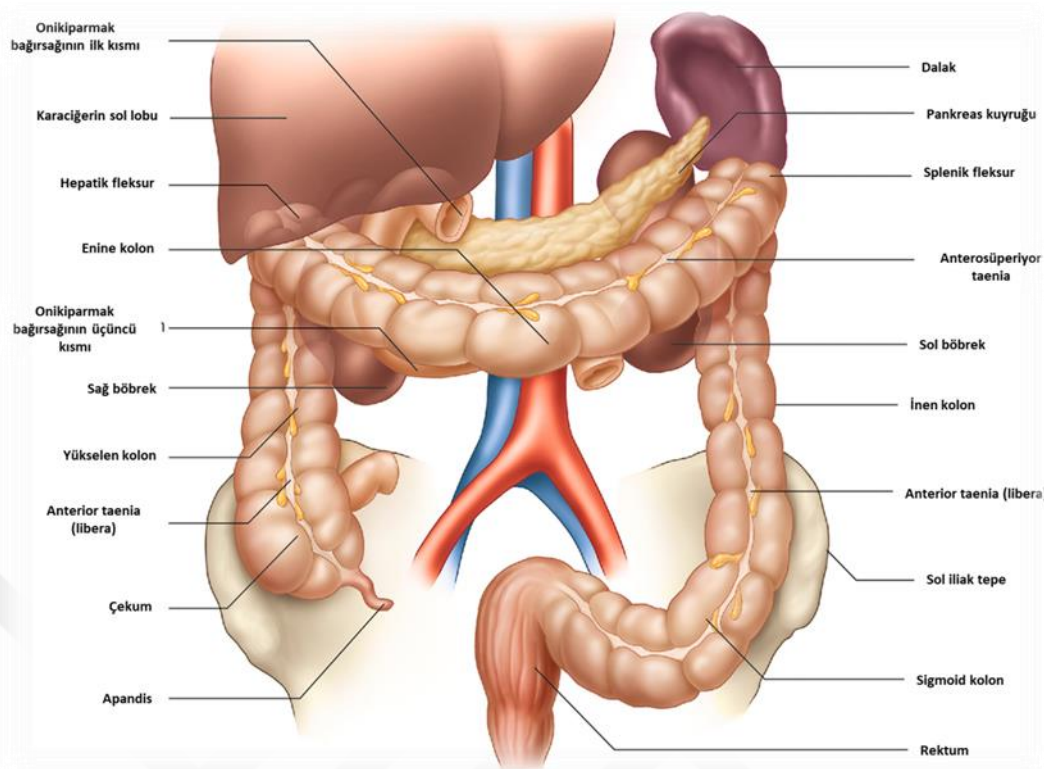
Tez çalışmasının konusu, aminolevulinik asit (ALA-5) fotoduyarlı maddesinin 635 nm lazer ve LED ışık kaynakları kullanılarak HT-29 kolon kanseri hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulamasının karşılaştırılması olarak incelenmesidir. Tez çalışmasında, ALA-5 aracılı FDT'nin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, kolon kanseri hücre hattı in vitro çalışmaları ile lazer ve LED ışık kaynakları kullanılarak ALA-5 fotoduyarlı maddesi için uygun klinik öncesi protokollerin belirlenmesi, uygun dozların literatüre ve klinik çalışmalara kazandırılmasına katkı sağlamaktır. Ayrıca literatürde ALA-5 aracılı fotodinamik terapinin kolon kanseri üzerinde çok çalışma olmaması, tezimize bu manada da özgünlük katarak literatüre katkı sağlayacaktır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kolorektal Kanser

2.1.1. Kolon anatomisi

Kolon ve rektum, genel olarak bağırsak adı ile adlandırılan sindirim sisteminin segmentini oluşturur. Kolon, ileumun ucundan ileoçekal valf ve apendiks dahil olmak üzere sigmoid kolon ve rektum arasındaki bağlantıya uzanan ve ince bağırsakları bir kemer gibi saran tübüler yapıdır. İnce ve kalın bağırsaklar arasındaki anatomik farklılıklar pozisyon, çap ve fiksasyon derecesi kolonda üç farklı yapının varlığını içerir: taeniae coli, haustra ve epiploik apendiksler. Kolon kaslı bir duvara sahiptir ve artan çapı haustranın varlığı, epiploika ve tenia coli ile ince bağırsaktan ayırt edilebilir. Tenia, üst rektumda sürekli bir uzunlamasına kas ceketini oluşturmak için abdominal kolon boyunca devam eden ve apendiks tabanından başlayan liflerinin yoğunlaşmasından oluşur [12-14]. Kolonun vasküler besleme ve ekstrapitoneal veya retroperitoneal yerleşimi ile tamamlanan 5 bölüme ayrılır: çekum (apendiks), yükselen kolon (ascending colon), enine kolon (transvers colon), inen kolon (descending colon), sigmoid kolon ve rektum. Kolonun uzunluğu değişken olmakla birlikte ortalama 150 cm uzunluğunda, ince bağırsakların yaklaşık dörtte biri kadardır [12-15].



Şekil 2.1. Kolon anatomisi [16]

Çekum, kolonun ilk ve en geniş kısmıdır. Yaklaşık 6-8 cm çapındadır. Çekum posterior psoas kası ve femoral kutanöz sinire yakındır. Çekum duvarı, diğer kolon segmentlerinin duvarlarına kıyasla incedir. Birçok insanda çekum yüzeyinin %90'ından fazlası periton ile kaplıdır. Terminal ileum mezenterinden ayrılan bir periton kıvrımı, kolon ve çekumun alt kısmına bağlanmak için ileumun üzerinden geçebilir. Buna superior ileoçekal kat denir ve antreior çekum arteri içinden geçer. Terminal ileumun ön kısmında ve apendiks mezenterin ön kısmında, alt ileoçekal kat vardır ve içinden anatomik bir yapı geçmez. İleum, insanlarda ileoçekal valf adı verilen ve çekuma doğru uzanan konik bir papiller yükseklik ile açılır. Bu valf sadece çekum içeriğinin ileum içerisine tekrar yapışmasına engellemekle kalmayarak ileal içeriğin çekuma çok hızlı geçmesini önlemektedir [12, 14, 15].

Apendiks vermiformis, çekumun posteromedial yönünden ileoçekal birleşme yerinden yaklaşık 3 cm uzaklıkta, tek tarafı kapalı boru şeklindeki yapıdır. Uzunluğu yaklaşık 2-20 cm (ortalama 8-10 cm) ve çapı 5 mm'dir. Yüksek hareket kabiliyeti nedeniyle apendiks birçok pozisyonda ve aynı kişide farklı zamanlarda çeşitli

pozisyonlarda bulunabilir. İnsanların %85'inde posteromedial pozisyonda olduğu tahmin edilmektedir [12-16].

Yükselen kolon sağ böbreğe ve duodenuma (onikiparmak bağırsağı) anteriordur ve yaklaşık 15 cm uzunluğundadır. Yükselen kolonun önü ve her iki tarafı periton ile kaplıdır.

Enine kolon, kolonun keskin bir şekilde sola döndüğü noktada (hepatik fleksiyon), sağ lobun alt yüzünün karaciğerin hemen altında başlar. Yaklaşık uzunluğu 45 cm'dir ve kolonun en uzun segmentidir. Enine kolonun tamamı periton ile kaplı olması ve arka karın duvarına uzun bir mezenter ile bağlanması, hareket kabiliyetini sağlamaktadır. Enine kolon mezenteri ile pankreas ve sol böbrek hilusundan geçerek batını alt ve üst bölmeye ayırır; aynı zamanda bu bölge bulaşıcı durumlarda her iki bölmeyi ayıran bir bariyer gibidir. Enine kolon mezenteri, lenf düğümleri ve sinirler ile birlikte orta kolik arter ve veni içermektedir.

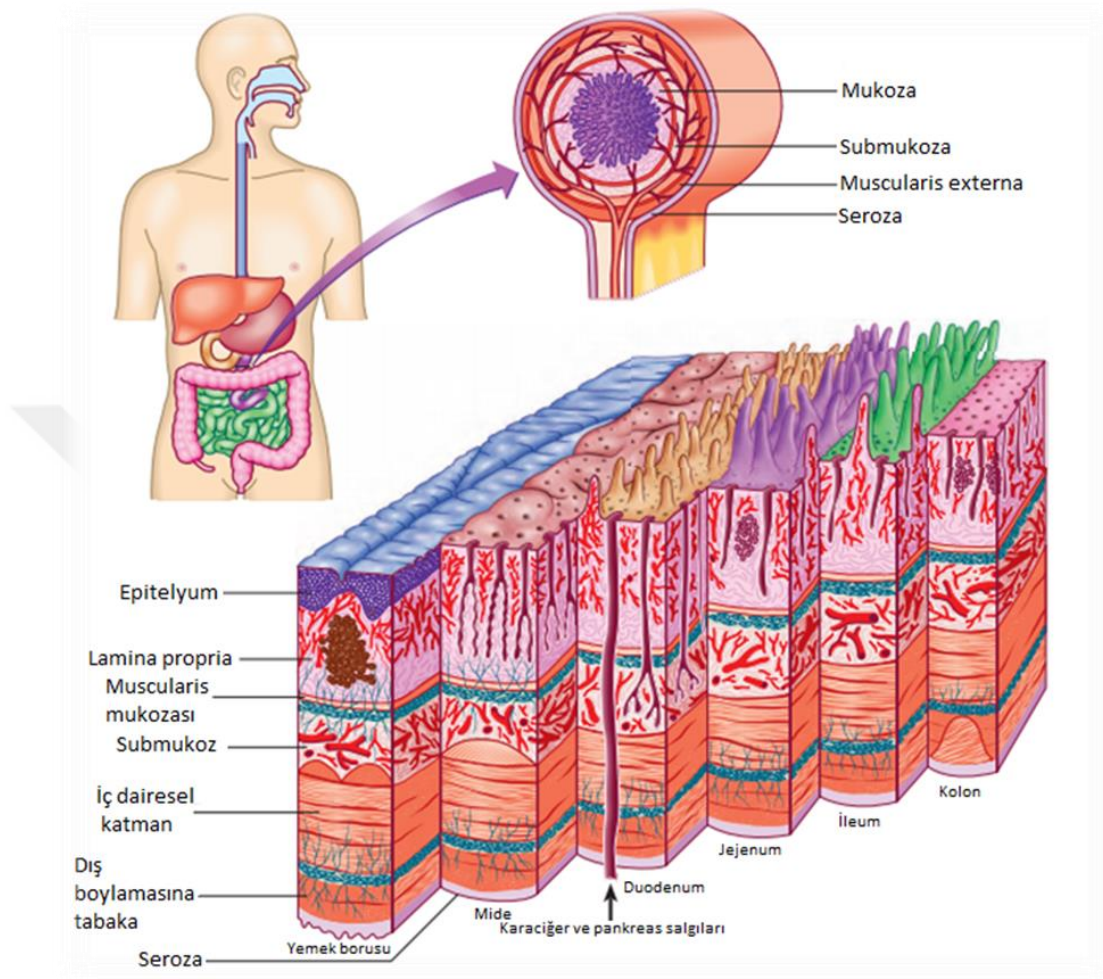
İnen kolon, splenik fleksuradan pelvis girişine uzanan ve yaklaşık 25 cm olan kolon segmentidir. Yükselen kolon gibi medial ve lateral yüzeyleri peritonla çevrilidir ve kısa bir mezoklon içerir. Yükselen kolon ile karşılaştırıldığında daha derin bir yerleşime sahiptir ve özellikle genç kadınlarda posterolateral olarak yerleşmiştir.

Sigmoid kolon genellikle tamamen periton ile kaplıdır. Ortalama uzunluğu 35-40 cm olan sigmoid kolon uzunluk, pozisyon ve sabitlenme açısından farklılıklar gösterebilir. İnen kolon iliak krest seviyesine geldiğinde sigmoid kolon ve bir mezenter olur. Genellikle V şeklinde ve bazen de U şeklinde bir mezoklon içerir [12,14,15].

2.1.2. Histoloji

Kolon, ışık mikroskobu ile kolayca görülebilen birkaç eş merkezli katmandan oluşur. Lümen dışına doğru bu katmanlar şunlardır: kolon epitelyumu, lamina propia,

muscularis mukoza, submukoza, muscularis propria (iç dairesel bir tabaka ve düz kasın dış uzunlamasına tabakasını içerir) ve seroza [15].



Şekil 2.2. Bağırsak duvarı katmanları [14]

2.1.3. Fizyoloji

Kolon dört ana işlevi yerine getirmek için gelişmiştir, bunlar:

1. Kolonik içeriğin rektuma ve anüse doğru itilmesi,
2. İntralüminal içeriklerden su ve elektrolitlerin emilmesi,
3. Yerleşik mikrobiyota tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin emilimi
4. Defakasyon'dur.

Kolonun ana görevi dışkıların geçici olarak depolanması ve taşınmasıdır. Böylece günlük olarak yaklaşık 1 litre su emer ve bu da dışkının kalınlaşmasına neden olur. Ayrıca sodyum, potasyum ve klorür emilimi sağlarken lümenin kendisine potasyum salgılayabilir. Fizyolojik bağırsak florası, insan vücudu ile simbiyoz halinde yaşayan anaerobik bakteriler (yaklaşık gram içerik başına $10^{10} - 10^{11}$ bakteri) bakımından zengindir. Sindirilemeyen gıda bileşenlerinin (örn. selüloz) ayrıştırılması, K vitamini üretilmesi, bağırsak peristaltizminin teşvik edilmesi ve bağışıklık sisteminin desteklenmesi gibi temel işlevleri yerine getirirler [17, 18].

2.1.4. Kolorektal kanser epidemiyolojisi

Kolorektal kanser, her yıl bir veya 2 milyon yeni vaka teşhisi konan dünya çapında en yaygın olarak üçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Cinsiyete göre bakıldığında zaman kadınlarda en sık görülen ikinci, erkeklerde ise üçüncü sırada yer alan ve bununla birlikte buna bağlı ölümleri %10 oranında etkileyen kanser türüdür. Kolorektal kanser insidansı 50 yaşın üzerindeki kişilerde anlamlı bir şekilde artmaktadır ve kolorektal kanser gelişme olasılığı kadınlarda erkeklere göre daha yüksektir [19-21]. Globocan 2018 verilerine göre kolorektal kanser, küresel kanser insidansının %10.2'sini (1.8 milyon yeni vaka) ve küresel kanser ölümünün %9.2'sini (881.00 ölüm) oluşturmaktadır. Yine Globocan 2018 verilerine göre melanom dışı cilt kanseri hariç en sık görülen 5 kanser türü: akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroit kanserlerdir. Türkiye'deki kanser insidansının %5.4'ünü kolorektal kanser oluşturmaktadır. Yeni vakalarda görülme sıklığı altıncı sırada iken kolon kanserine bağlı ölümlerin görülme sıklığında üçüncü sırada yer almaktadır [22]. Halk sağlığı genel müdürlüğü verilerine göre 2009 ve 2014 yılları arasında erkeklerde kolorektal kansere yakalanma oranı yüz binde 20 ile 22 arasında seyrederken kadınlarda bu oran yüz binde 13 ile 15 arasında değiştiği görülmüştür [23]. Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %41'i proksimal kolonda, %22'si distal kolonda ve %28'i rektumda görülmektedir. Hastalık en sık olarak Kuzey Amerika'nın sanayileşmiş ülkelerinde görülmektedir. Doğu ve Batı Avrupa, İskandinav ülkeleri, Yeni Zelanda ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde olmak üzere tüm dünyada rastlanan bir kanser türüdür. Ancak kişinin kökenine, yaşına ve cinsiyetine bağlı olarak potansiyel

farklılıklar görülebilir. Afrika kökenli Amerikalılar, Hintliler, Hawaiiiler ve Meksikalılar en yüksek insidans ve ölüm oranına sahiptir [19, 24]. Kolorektal kanser insidansı ve mortalite oranları dünya genelinde 10 kata kadar değişmekte olup kolorektal kanser insidansı ve mortalitesindeki paternler ve eğilimler, mevcut insani gelişme seviyeleri ile ilişkilidir [6]. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte tarama, teşhis ve tedavideki gelişmeler kolorektal kanser mortalitesinde azalmaya katkıda bulunmuştur. Özellikle bu azalma beyaz ırkta belirginken, siyah ırkta kolorektal kanser insidansında azalma saptanmamıştır. Sosyaekonomik değişiklikler ve biyolojik faktörlerin bu ırksal farklılıkların oluşmasında etken rol oynadığı düşünülmektedir. Diyet ve çevresel faktörlerin de aynı ülke ve yörelere göre farklılıklar göstermesinde etkili olduğu düşünülmektedir ve nitekim yüksek yağ ve düşük lif içeren diyetle beslenen toplumlarda kolorektal kanserin daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir [20-27].

2.1.5. Kolorektal kanserin moleküler mekanizması

Kolorektal kanser sporadik veya kalıtsal olabilir ve birden fazla moleküler yolla ortaya çıkabilmektedir. Genomik ve epigenomik instabilite, neoplastik maddeyi normal kolon epitelinden ayırır ve kolorektal karsinogenezin ayırt edici bir özelliğidir [28-30]. Genomik ve epigenomikler, kolorektal kansere özel değildir fakat her ikisi de kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır.

Kolorektal kanserin moleküler çalışmaları sonucu, kanser gelişiminde çeşitli sinyal yollarının yer aldığı bilinmektedir. Kolorektal kanserlerin çoğu adenomlarda geliştiği kabul edilmektedir ve normal epiteliden adenom karsinoma geçiş birçok moleküler olaylarla ilişkilidir [31-33].

Genomik ve epigenomik instabilite, neoplastik maddeyi normal kolon epitelinden ayırır ve kolorektal karsinogenezin ayırt edici bir özelliğidir [28-30]. Kolorektal kanserlerde çeşitli genomik veya epigenomik instabilite tanımlanmıştır: kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve CpG ada metilat fenotipi (CIMP) [34].

Kromozomal instabilite yolu, tüm kolorektal kanser vakalarının %80-85'ine neden olduğu için klasik yol olarak kabul edilmiştir ve kromozom sayısındaki değişiklikler ile ilişkilidir [35]. Bu karsinomlar genellikle yüksek oranda anaploiddir ve gen kopya sayısında çarpıcı değişiklikler göstermektedir. Bu moleküler yol, ailesel adenomatöz polipozdan (FAP) sorumlu olan adenomatöz polipolizis coli (APC) geninin keşfiyle birlikte anlaşılmıştır [36, 37]. Kromozomal instabilitenin temelini oluşturan mekanizmalar arasında kromozom ayrımı, telomer disfonksiyonu ve DNA hasar yanıtındaki değişiklikler; APC, K-RAS, PI3K ve TP53 gibi hücre fonksiyonlarının korunmasında rol oynayan kritik genleri etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kolorektal kanser gelişimini ve ilerlemesini etkilemektedir [38, 39].

Mikrosatelitler, genom boyunca dağılmış basit tekrarlayan DNA dizileridir. 100 kata kadar tekrarlanabilen bir veya daha fazla baz çiftinden oluşurlar. Tekrarlayan yapıları nedeniyle DNA replikasyonu sırasında oluşabilecek hatalardan sorumludurlar [40]. Kısa DNA zincirlerini veya tekrar dizilerini (2-5 baz çifti) onarma yeteneği mikrosatelit instabilite olan tümörlerde azalmaktadır. Bu nedenle mutasyonlar bu bölgede birikme eğilimindedirler ve tümör geliştirmektedirler. Mikrosatelit instabilite olan tümörlerde mutasyona uğrayan genler arasında MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2 bulunur [41]. Mikrosatelit instabilite yolağı, kromozomal instabilite karsinomlarının aksine genellikle az anaploidi göstermektedir. Aynı zamanda DNA tamir mekanizmalarının kaybına bağlı olarak hipermutasyon karsinomlarının gelişmesinden sorumludur. Bu yollar Lynch sendromu olarak bilinen kalıtsal polipozis olmayan kolon kanserinin (HNPCC) moleküler genetik kökenleri araştırılırken keşfedilmiştir [42]. Genel olarak mikrosatelit instabilite tümörleri sporadik tümörlerden daha iyi prognoza sahiptir [34].

CpG ada metilat fenotipinden sorumlu olan epigenomik instabilite, kolorektal kanserde başka bir yaygın özelliktir. İnsan genlerinin yaklaşık %50'sinde görülen CpG adaları, sitozin ve guanin kalıntılarının bulunduğu bölgelerdir. Metilasyon, birçok genin promotör bölgesinin yakınında CpG adalarının (Guanin-Sitozin ve CpG bakımından zengin bölgeler) sitozin kalıntılarında meydana gelmektedir. CpG ada

metilat fenotipi tümörlerinin temel özelliği, genetik susturma ve protein ekspresyonu kaybına yol açan onkojen promotörlerinin hipermetilasyonudur [43, 44].

2.1.6. Kolorektal kanserin risk faktörleri

Kolorektal kanserin oluşma sebebi tam olarak bilinmemektedir; fakat bazı risk faktörlerinin bu kansere yakalanma riskini artırdığı gözlemlenmiştir. Kolorektal kanser gelişiminde yaş, genetik ve çevresel faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Kalıtsal faktörlerin neden olduğu kolorektal kanserinin dışında en önemli ana risk faktörü yaş olarak kabul edilmektedir ve hastalığa yakalananların %90'ından fazlası 50 yaş ve üzeri insanlardan oluşmaktadır [3, 25]. Yaşa ek olarak, değiştirelemeyen başka risk faktörleri vardır. İltihaplı bağırsak hastalığı öyküsü-ülseratif kolitli hastalarda risk %3.7 artarken, Crohn hastalığı olan kişilerde kolorektal geliştirme riski %2.5 daha yüksek risk taşımaktadır. İltihaplı bağırsak hastalığında bulunan kronik inflamasyon sıklıkla anormal bir hücre büyümesi olarak bilinen displazi üretir. Displastik hücreler henüz malign olmasa da, anaplastik olma ve bir tümör haline gelme şansı yüksektir. Bu gruba dahil edilebilecek diğer risk faktörü, özellikle 50 yaşın altındaki kişilerin aile öyküsüdür. Aile geçmişine bağlı artmış bir risk, kalıtsal mutasyanlardan veya çevreden kaynaklanabilir [20].

Lynch sendromu (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser), ailesel adenomatoz polipozis (FAP), MUTYH ile ilişkili polipozis (MAP) kalıtsal kolorektal kanser sendromlarıdır. Lynch sendromu ve ailevi adenomatoz polipozis, tüm kolorektal kanser insidansının %5'ini oluşturmaktadır. Birinci derece akrabalarda kolon kanseri aile öyküsü olması, kişide kalıtsal kolon kanseri sendromları olmasa bile vakaların yaklaşık %20'sinde kolorektal kanser gelişim riskini artırmaktadır. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında, birince derece akrabalarda kolorektal kanser öyküsü olan kişilerde risk iki kattan fazla artmaktadır [25].

Yaşam tarzıyla ilgili bazı risk faktörleri diyet ve fiziksel aktivite alışkanlıklarıdır. Kolorektal kanser insidansında azalma ile ilişkili koruyucu faktörler arasında düzenli fiziksel aktivite, meyve ve sebzelerde zengin diyet, yüksek lifli diyet, folat

bakımından zengin diyet, kalsiyum, süt ürünleri, D vitamini, B6 vitamini, magnezyum alımı, balık, sarımsak tüketimi, düzenli olarak aspirin kullanımı, Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAIDs) yer alır. Örneğin, hareketsiz bir yaşam tarzının kanser riskini artırdığı düşünülmektedir ancak kolorektal kanser ile hareketsizlik arasındaki bu ilişki tam olarak tanımlanamamıştır. Bununla birlikte orta derecede fiziksel aktivitenin metabolik hızları, bağırsak hareketliliğini, uzun vadede metabolik etkinliği artırdığı ve kan basıncını düşürdüğü kanıtlanmıştır [20, 25]. Hareketsiz yaşam tarzı, kolorektal kanser için bir diğer risk faktörü olan obezite ile de ilgilidir. Çok sayıda gözlemsel çalışma obezite ve kolorektal kanser riski arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Mendelian Randomizasyon Çalışması'nda, obezite ve kolorektal kanser ile cinsiyet arasındaki ilişki incelenmiştir [45]. Bunun sonucunda obezite ve kolorektal kanser ile kadınlar arasında erkeklere göre daha güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu risk hem gıda alımı hem de proinflamatuar sitokinlerin salgılanması yoluyla kolorektal kanser gelişimi teşvik edebilen hormonal olarak aktif bir vücut yağ bileşeni olan visseral adipoz doku seviyelerinin bağlantılı olması kolon ve rektumda inflamatuara, insülin direncine ve adiponektin veya lektin gibi metabolik enzimlerin modülasyonuna yol açar. Bu bağlamda diyet, sağlıksız beslenme alışkanlıklarının kolorektal kanser geliştirme şansını %70'e kadar arttırma riski ile güçlü bir bağlantısı vardır. Örneğin, kırmızı et, kanserojen N-Nitroso bileşiklerinin yanı sıra sitotoksik ve genotoksik aldehytlerin lipoperoxidasyonla oluşumunu artıran bağırsaktaki heme gruplarını serbest bırakır. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda pişirilen et sindirimden sonra heterosiklik aminler ve polisiklik hidrokarbonlar üretir. Her ikisinde potansiyel kanserojen olarak kabul edilmektedir. Shivappa ve arkadaşları besinlerin Diyet inflamatuvar indeksinin kullanımı ile kolorektal kanserin bazı yiyeceklerde görülme riskinde artış olduğunu göstermiştir [20, 25].

2011 yılında Fedirko ve arkadaşlarının, 2004 yılında Cho ve arkadaşlarının, 2008 yılında Mizoue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda alkol tüketimi ile kolorektal kanser insidansı arasında nedensel bir ilişki olduğu görülmüştür [25]. Alkol tüketimi durumunda, asetaldehit alkol metabolizması enzimlerin polimorfizmlerine bağlı olarak yani DNA sentezini, onarımını, yapı ve işlevini glutatyon fonksiyonunu

değiştirerek ve kolon mukozal proliferasyonundaki artışı etkileyerek popülasyonlar arasında kolorektal kanser gelişme riskini artıracak kanserojen olarak tanımlanmıştır [25, 46].

Tütün kullanmak, nikotin gibi kanserojenlerin yüksek içeriğinden dolayı metabolitleri bağırsaklara kolayca erişebilen ve polipler üretebilen, nikotin gibi kanserojen madde içeriğinin olması kolorektal kansere yakalanma riskini %10.8'e kadar atmasına neden olabilmektedir. Sigara içmek kolorektal kanser riskini arttırmasına rağmen, sigarayı bırakıp bırakmadıklarına bakılmaksızın, yalnızca uzun süreli sigara içenler için önemli bir ilişki olduğu bulunmuştur [20].

Epidemiyolojik çalışmalar, D vitamini için kolorektal kanser gelişiminde koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda diyet kalsiyum ve kalsiyum takviyelerinin kadınlarda kolorektal kanser riskini azalttığını göstermektedir [25].

Genel olarak bakıldığında kolorektal kanser etiyojisinde diyet şu ana kadar tanımlanan en önemli eksojen faktör olmuştur. Son zamanlarda Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü, diyet, fiziksel aktivite ve kanserin önlenmesi ile ilgili bilimsel literatürdeki kapsamlı raporlarında, kolorektal kanserin çoğunlukla uygun diyetler ve ilişkili faktörler tarafından önenebilir olduğu sonucuna varmışlardır [46].

2.1.7. Kolorektal kanserin tanı ve evrelendirilmesi

Kolorektal kanser, bir hasta semptomlar gösterdiğinde veya bir tarama programının sonucu olarak teşhis edilebilir. Kanserleri tıkanıklığa neden olan veya perforasyon olan hastalar dışında, semptomların süresi prognoz ile ilişkili değildir. Erken kolorektal kanser semptom üretmediğinden ve kolorektal kanser semptomlarının çoğu spesifik olmadığından tarama programları ile tespit edilmeye yönelik uğraşlar gerekmektedir. Tüm kolorektal kanserler için genel belirti ve semptomlar bağırsak alışkanlıklarında bir değişiklik, dışkıda kan, abdominal çift, anoreksi, demir eksikliği

anemisi, karın ağrısı, şişkinlik, hazımsızlık, enerji, kilo kaybı ve genel sağlıkta bir azalma yer almaktadır. Belirtiler büyüklük, yer, tümör tipi ve kişiye göre büyük ölçüde değişebilir. Genellikle bu semptomlar diğer bağırsak sendromları ile karıştırılmaktadır [47, 48]. Kolorektal kanser tanısı konan kişilerin yaklaşık %20'sinde metastatik hastalık vardır. Metastaz lenfatik yayılma, hematojen yayılma, bitişik veya transperitoneal yayılma ile oluşur. Kolorektal kanserin en yaygın metastaz bölgeleri arasında bölgesel lenf düğümleri, karaciğer, akciğer ve periton bulunur. Metastazların bulunduğu bölgeye bağlı olarak, semptomlar: tümörün direkt yayılımı, sarılık ve sağ üst kadranda ağrısı (karaciğer), supraklaviküler lenfadenopati, ağrılı umbilikal nodüller, nefes darlığı (akciğerler) nedeniyle karın ağrısı, perforasyon ve apse olabilmektedir. Kanser evresi ne olursa olsun bağırsak tıkanması ve/veya perforasyonu kötü bir prognoz anlamına gelmektedir [25]. Hastalık için yüksek risk altında veya semptomları olan ve gaita gizli kan testi pozitif olan kişilere ek tanı testleri gerekmektedir. Aletsel ve patolojik değerlendirme için endoskopi, sigmoidoskopi veya kolonoskopi kullanılarak teşhis yapılmaktadır. Potansiyel olarak metastatik lezyonlar için radyolojik teknikler kullanılmaktadır. Kontraslı göğüs röntgeni filmleri ve karaciğer, kemik ve bilgisayarlı tomografi (BT) taraması, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), pozitron emisyon tomografisi (PET), rektal ultrason dahil tüm taramalar kullanılarak değerlendirilmektedir. Kolorektal kanserin erken teşhisine izin verecek serolojik belirteçlerin araştırılması için çok çaba harcanmıştır. En yaygın belirleyici olan karsinembriyonik antijen (CEA), CA19-9 karbonhidrat antijeni teşhis için kullanılan biyolojik belirteçlerdir. CEA seviyeleri gibi tümör belirteç seviyeleri kolorektal kanserde yükselse de, kolorektal kanserin teşhisinden ziyade tedavi sonrası takip ve sürveyansı izlemek için bir araç olarak kullanılmaktadır [24, 48].

Tedavi kararları genellikle daha eski Düklere veya Modifiye Astler-Coller (MAC) sınıflandırma şemasına atıfta bulunur [48]. Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) ve Kanserle Mücadele Uluslararası Birliği (UICC) tarafından tümör düğümü metastaz sistemi veya TNM sistemi kanser türlerinin evrelendirilmesi için kullanılmaktadır. T, primer tümörün boyutunu; N, herhangi bir lenf bezinde kanser

olup olmadığını; M, kanserin uzak bölgelere yayılmış olup olmadığını ifade etmektedir (Tablo 2.1.) [25, 47, 48].

Tablo 2.1. TNM sınıflandırma sistemi [47]

Primer tümör (T)	Açıklama
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ: intraepitelyal veya lamina propria invazyonu
T1	Tümör submukozayı invaze etmiş
T2	Tümör muscularis propriayı invaze etmiş
T3	Tümör muscularis propriadan sonra postrozaya veya peritonealize olmayan perikolik veya perirektal dokulara girer
T4	Tümör doğrudan diğer organları veya yapıları ve / veya perforatları işgal eder
Bölgesel lenf düğümleri (N)	
Bölgesel lenf düğümleri (N)	Açıklama
NX	Bölgesel düğümler değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-3 bölgesel lenf nodunda metastaz
N2	4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz
Uzak metastaz (M)	
MX	Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Tablo 2.2. TNM sistemi ve kanser evresi arasındaki ilişki [48]

EVRE	TNM	Cerrahi rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağ kalım
Evre 0	Tis, N0, M0	
Evre 1	T1, N0, M0 T2, N0, M0	%85-95
Evre 2A	T3, N0, M0	
Evre 2B	T4, N0, M0	%60-80
Evre 3A	T1-2, N1, M0	
Evre 3B	T3-4, N1, M0	%30-60
Evre 3C	Herhangi bir T, N2, M0	
Evre 4	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1	

2.1.8. Kolon kanseri tedavisi

Kolon kanseri tedavi yöntemi tümörün kolon ve rektumdaki yeri ve hastalığın evresine bağlı olarak değişmektedir (Tablo 2.3.). Var olan duruma göre ameliyat, kemoterapi, biyolojik terapi veya radyasyon tedavisi gerekebilir.

Genel tedavi stratejisi cerrahi, tedavi edilebilir potansiyel kolorektal kanserden etkilenen hastalar için birincil tedavi yöntemidir. Adjuvan tedavi, nüks ve ölüm riskini azaltmak amacıyla uygulanan sistemik bir tedavi yöntemidir. Nüks oranı patolojik evreleme ile tahmin edilebilir. Adjuvan kemoterapi evre III hastalarında bir standart tedavi iken, evre II'de rolü daha az olmaktadır. Metastatik hastalıkta kemoterapi, sağ kalımı uzatmak, yaşam kalitesini artırmak ve sürdürmek amacıyla ilk tedaviyi temsil etmektedir [3, 48]. Kolorektal kanser tedavisi; yerel tedaviler, sistemik tedaviler ve ortak tedavi yaklaşımları şeklindeki tedavi yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir.

Cerrahi tedavi, özellikle kolon kanseri hastaları için standart bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ameliyatın ne şekilde olacağı kanserin evresine, yerine ve ameliyatın amacına bağlı olarak değişmektedir. Kanserın erken aşamalarında rektumdan kolon içine girilerek kanser alınırsa bu tedavi şekline lokal eksizyon denmektedir. Kanser bir polipte bulunursa, bu operasyona polipektomi denmektedir. Bu operasyonlar genellikle kanserin erken aşamalarında uygulanmaktadır. Kanser eğer daha büyük ise kolonun tümü ya da bir kısmını çıkarmak için kolektomi denilen cerrahi işlem uygulanmaktadır. Bu cerrahi işlem sonucu atıkların geçmesi için vücut dışına bir açıklık yapılır ise bu işleme kolostomi denmektedir. Cerrahi işlemler sonrasında kalan ya da kalabilecek olan kanser hücrelerini yok etmek için hastaya kemoterapi veya radyasyon tedavisi verilebilmektedir. Ameliyattan sonra kanserin geri gelme riskini azaltmak için yapılan bu tedavilere adjuvan tedavi denmektedir [49-54].

Kolorektal kanser yayıldığında ve birkaç küçük tümör varsa (karaciğer veya akciğerde) bu metastazlar bazen ameliyatla çıkarılabilir veya ablasyon veya

embolizasyon gibi başka tekniklerle tedavi edilebilmektedir. Ablasyon, küçük tümörleri (4 cm'den az) çıkarmadan yok eden tedavileri ifade etmektedir. Radyofrekans ablasyonu, mikrodalga ablasyonu, etanol ablasyonu, kriyocerrahi gibi çeşitleri bulunmaktadır. Radyofrekans ablasyonu, özellikle karaciğere metastaz yapmış kanseri tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Embolizasyon, ablasyon ile tedavi edilemeyecek kadar büyük olan tümörler için, genellikle 5 cm'den (yaklaşık 2 inç) daha büyük olan tümörler, kullanılabilir ve ablasyon ile birlikte de kullanılabilir. Embolizasyon karaciğere metastaz yapmış kolorektal kanserlerini kemoterapi veya radyoaktif boncuklarla tedavi eden bir yöntemdir. Bu tedavi bir tür arteriyel yönelimli kateter tedavidir. Bu yöntem, doktorların tedavide karaciğerin sağlıklı kısımları ve vücudun geri kalan bölümleri üzerindeki etkilerini sınırlandırırken, metastatik tümörleri tedavi etmelerini sağlamaktadır. Karaciğere metastazlı kolorektal kanseri tedavi etmek için kullanılan 3 ana embolizasyon prosedürü vardır: Arteriyel embolizasyon, kemoembolizasyon ve radyoembolizasyon [49, 50, 53, 54].

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini yüksek enerjili ışınlar (x-ışınları gibi) veya parçacıklar kullanarak yok etmeyi amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Radyasyon tedavisi, rektal kanserli hastaların tedavisinde daha sık tercih edilmektedir. Aynı zamanda farklı tiplerde kanserleri tedavi etmek için çeşitleri bulunmaktadır: dış ışın radyasyon tedavisi (EBRT), intraoperatif radyasyon (IORT), brakiterapi, radyoembolizasyon [49, 50, 55-57].

Kolorektal kanser, ağız yoluyla veya doğrudan kan dolaşımına verilebilen ilaçlar kullanılarak da tedavi edilebilir. Bunlara sistemik tedaviler denir çünkü vücuttaki kanser hücrelerine ulaşabilirler. Kolorektal kanser tipine bağlı olarak, aşağıdakiler gibi farklı tipte ilaçlar kullanılabilir: kemoterapi, hedefli terapi ilaçları, immünoterapi.

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldüren ilaçlarla yapılan tedavi şeklidir. İlaçlar damar yolu veya ağız yolu ile alınırsa buna sistemik kemoterapi denmektedir. İlaçlar bu yol ile vücudun diğer bölgelerine ulaşarak kanserin vücutta başka bölümlere yayılma

riskini azaltmaktadır. İlacın, tümörün bulunduğu bölgeye arter ile verilmesine bölgesel kemoterapi denmektedir. Bu sayede ilacı kanserin bulunduğu bölgeye odaklayarak vücudun diğer bölgelerine giden ilaç miktarını sınırlar ve böylece yan etkiyi azaltmaktadır. Kemoterapide yaygın olarak kullanılan bazı ilaçlar: 5-FU/LV, Capecitabine, CAPEOX, FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI, Irinotecan, Trifluridine+tipiracil'dir [13, 49, 50, 58, 59].

Bazı kolon ve rektum kanserleri için kemoterapi ile aynı anda tedavi etmek radyasyon tedavisini daha iyi çalışmasını sağlayabilmektedir. Bu iki tedavinin aynı anda kullanılmasına kemoradyasyon veya kemoradyoterapi denir [49, 50, 60-62].

Hedefli terapi, belirli kanser türlerini hedefleyebilen ve bunlara saldırabilen bir tür kanser tedavisidir. Farklı hedefli tedaviler farklı şekilde çalışır. Bir türü yeni kan damarlarının kolon tümörlerine büyümesini durdururken başka bir hedefli tedavi türü ise kanser hücrelerinin büyümek için aldığı sinyali önlemektedir. Hedefli terapide kullanılan bazı ilaçlar: Bevacizumab, Ramucirumab, Ziv-aflibercept, cetuximab, Panitumumab, Regorafenib, Vemurafenib [49, 50, 63-65].

İmmünoterapi adı verilen yeni kanser tedavisi bağışıklık sisteminin aktivitesini artırarak vücudun kanser hücrelerini bulma ve yok etme yeteneğini geliştirir. Kontrol noktası inhibitörleri olarak adlandırılan bu ilaçlar kolon kanserini tedavi etmek için kullanılan bir immünoterapi türüdür. İmmünoterapide kullanılan bazı ilaçlar: Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab [49, 50, 66-68].

Tablo 2.3. Kolorektal kanserde tedavi seçenekleri [47]

EVRE		Tedavi önerisi
EVRE 0	Evre 0 kolon kanseri tüm lezyonların en yüzeyselidir ve lamina propria invazyonu olmayan mukoza ile sınırlıdır. Yüzeysel doğası nedeniyle cerrahi prosedür sınırlı olabilir.	1. Lokal eksizyon veya basit polipektomi. 2. Lokal eksizyona uygun olmayan daha büyük lezyonlar için segment rezeksiyonu.
EVRE I	Kanser, kolon duvarının ikincil veya üçüncü katmanında büyümüştür. Lokalize doğası nedeniyle, I. aşama yüksek bir kür oranına sahiptir.	1. Geniş cerrahi rezeksiyon ve anastomoz.
EVRE II	Kanser, kolon duvarının dördüncü veya daha ötesinde büyümüştür.	1. Geniş cerrahi rezeksiyon ve anastomoz. 2. Ameliyattan sonra, yüksek riskli hastalarda adjuvan tedavi düşünülebilir (Ameliyat sonrası adjuvan kemoterapi, radyasyon tedavisi veya biyolojik tedavinin dinamik çalışmalarına katılım için hastalar düşünülmelidir).
EVRE III	Evre III kolon kanseri lenf nodu tutulumunu gösterir.	1. Bu aşamadaki standart tedavi seçeneği oksaliplatin ve 5FU / LV (FOLFOX4 veya FLOX) ile bir çift programdır. Bazı dolaşımarda FU / LV ile çoğunlukla infüzyon programları (DeGramont, AIO rejimleri) veya oral floropirimidinler (kapesitabin veya UFT) ile monoterapi önerilebilir (tip 1).
EVRE IV	Kanser, kolondan uzak bölgelere yayılmıştır. Kolon kanseri sıklıkla ilk önce karaciğer ve akciğerlere yayılmaktadır.	Tedavinin temel amacı, yaşam süresini uzatmak ve yaşam kalitesini korumaktır. 1. Primer tümör / anastomozun cerrahi rezeksiyonu veya seçilmiş olgularda obstrüktif lezyonların baypas edilmesi. 2. İzole metastazların (karaciğer, akciğer, yumurtalıklar) tedavisi. 3. Palyatif kemoterapi. 4. Biyolojik tedavi. 5. Kanama, tıkanıklık veya ağrıyı hafifletmek için primer tümöre radyasyon tedavisi. Palyatif radyasyon tedavisi, benzer endikasyonlar için diğer metastaz bölgelerine de hedeflenebilir.

Hastalığın evresi, tümörün yeri, hastanın yaşı gibi faktörlere bakılarak uygun tedavi seçenekleri ile kolorektal kanser günümüzde tedavi edilebilmektedir. Fakat bu tedavilerin dezavantajları da bulunmaktadır (Tablo 2.4.) [48]. Geleneksel tedavilerin bu tarz yan etkileri ciddi anlamda hastanın yaşam kalitesini etkilemektedir. Bu anlamda bilim insanları geleneksel tedavilerin yaratmış olduğu yan etkileri minimuma indirecek ve hastaya en az hasar verecek tedavi yöntemlerine yönelmişlerdir.

Tablo 2.4. Kolorektal kanser teavisinin bazı dezavantajları

TEDAVİ	DEZAVANTAJLARI
Cerrahi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ameliyat sonrası ağrı, şişme olabilir ve ameliyat izi kalabilir. 2. Her ameliyatta olduğu gibi komplikasyon riski bulunmaktadır. 3. Ameliyat sonrası kolonda bazı hasarlar meydana gelebilir.
Kemoterapi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mide bulantısı, açlık hissetmemek, ishal, saç dökülmesi ve ağız yaraları gibi yan etkileri olabilir. 2. Bazı kemoterapi ilaçları duyuşal sinirlere zarar verebilir. 3. Alınan ilacın tipine, dozuna ve tedavi süresine göre farklı yan etkiler görülebilmektedir.
Radyoterapi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bu tedavi sadece kolon kanserine özgü değildir. 2. Genellikle yardımcı bir tedavi olarak kullanılmaktadır. 3. Yıpranmış hissetmek, tedavi bölgesinde saç dökülmesi, idrar ve bağırsak hareketlerinde değişiklikler, ishal, bulantı ve kusma gibi yan etkileri bulunmaktadır. 4. Geç yan etkilerinde ise kısırlık, cinsel işlev bozukluğu, bağırsak işlev bozukluğu ve azalmış kemik yoğunluğu gibi yan etkiler bulunmaktadır.
Hedefli terapi ve immünoterapi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kolon kanseri hastası olan herkes hedefli tedaviden ve immünoterapiden fayda görememektedir. 2. Kolon kanseri için hedeflenen tedavilerin çoğu (ancak tümü değil) infüzyonla verilmektedir.

2.2. Fotodinamik Terapi

2.2.1. Fotodinamik terapi tarihçesi

Antik çağlardan günümüze kadar ışığın kökeni araştırıldığında tıpta bir terapi yöntemi olarak ışığın kullanıldığı görülmektedir. Fototerapi, Eski Mısır, Yunanistan ve Hindistan'da başlamış fakat yüzyıllar boyu kaybolmuş ve daha sonra Batı uygarlığı tarafından yirminci yüzyılın başlarında yeniden keşfedilmiştir. Eski zamanlarda, cilt kanseri, raşitizm, vitiligo, sedef hastalığı ve bu hastalıklardan farklı olarak psikoz gibi rahatsızlıkların tedavisinde güneş ışığı kullanılmış olup tek başına güneş ışığının etkili olduğu düşünülmüştür. Güneş ışığı kullanılarak yapılan bu tedavi süreci, "fototerapi" veya daha önceleri kullanıldığı isimle "helioterapi" olarak bilinmektedir. Bilim ve teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, bu hastalıkların tedavi sürecinde genellikle endojen maddelerin olduğu ve fotodinamik tedavide ışığın iyileştirici güçlerini açıklamak için daha doğru bir mekanizma var olduğu tespit edilmiştir.

Eski zamanlara kadar dayanan fototerapi uygulamasıyla ilgili olarak elde edilen verilere göre bu uygulama Antik Mısır ve Hindistan'da M.Ö 3000 yıllarına kadar kullanıldığı tespit edilmiştir. Eski Mısırlılar, M.Ö 1550 yıllarında yazıldığı düşünülen Ebers Tıp Papirüsü'nden elde ettikleri bilgilere göre yabani havuç, kürdan otu, maydanoz, sarı kantaron gibi bitkileri toz haline getirerek lezyonlar üzerinde fototerapi yapmak için kullanmışlardır. Daha sonra hasta güneş ışığına maruz kaldığında güneş yanığına benzer etkisi olan cilt pigmentasyonu meydana gelmiştir. Başka bir kaynakta ise M.Ö 1400 yılına ait olan Hindistan'ın kutsal kitaplarından biri Atharva-Veda'daki bilgilere göre vitiligo hastalarında Bavachee bitkisi ve Psoralea Corylifolia'nın bazı bitki özleri kullanıldığı ve bu hastaların bir süre güneş ışığında durmaları istenmiştir.

Çin Han hanedanlığı döneminde M.Ö. birinci yüzyılda Lingyan Tzu-Ming tarafından fototerapi Çin'de tanıtılmıştır. Dört yüzyıl sonar Tang Hanedanlığı sırasında, insanların kırmızı boya ile yeşil bir kağıt parçasını güneş ışığına maruz bıraktıkları,

suya batırdıkları ve güneşin iyileştirici gücünden faydalanmak için kullandıkları bir uygulama haline gelmiştir.

Fototerapi ilk olarak tıp biliminin babası olarak adlandırılan Yunan doktor Hipokrat tarafından M.Ö. ikinci yüzyılda "helioterapi" ismini almıştır. Hipokrat sağlık açısından güneşi önermiştir ve güneş ışığı tedavisinin ünlü olduğu Mısır'a seyahatlerinden dolayı güneş ışığının iyileştirme gücünü fark etmiştir.

Gelişmeleri takip eden Romalılar, özellikle cilt hastalıklarında güneş ışığını bir tedavi yöntemi olarak kullanmaya devam etmişlerdir. Tarihte ün yapmış güneş ışığına maruz kalan hamamları icat etmişlerdir. Ne yazık ki Roma İmparatorluğu'nun çöküşü ve Hristiyanlığın yayılmasıyla, Roma hamamları ve helioterapi kavramı ortadan kalkmıştır. Daha sonra 13. yüzyılda İbn El-bitar, Mofradat Al Adwiya adlı kitabında bahsedilen "Farmasötik Terminolojileri" ile vitiligo hastalığı tedavisinde bal ve toz kürdan otu tohumlarıyla muamele edilmesini anlatmıştır. Bu tedavinin hem topikal tem de oral olarak uygulanmasının ardından hastalar, 1-2 saat boyunca güneşe maruz bırakılmıştır.

1800'lerin sonlarından 1900'lerin başına kadar fototerapi tekrar gelişmeye başlamıştır. İsviçre'nin doğal şifacı ve doktoru olan Arnold Rikli, güneş ışığının iyileştirici etkilerini yeniden ortaya koymuştur. Bu manada, modern fototerapinin öncüsü olarak kabul edilmiştir. Dünyanın dikkatini ışığın, havanın ve güneşin değerine çeken ilk kişi olmasına rağmen yazılarının çoğu İngilizceye çevrilmediğinden iyi tanınmamıştır. 1855 yılında Slovenya'nın Bled kentinde ulusal Tıp Enstitüsü kurmuş ve 50 yıl boyunca bugün hala geçerli olan doğal tedavileri geliştirmek için çalışmıştır. Arnold Rikli'nin şu sözü "Su iyidir, hava daha iyidir ve ışık her şeyin en iyisidir", helioterapinin çekirdeği olarak kabul edilir.

Lupus Vulgaris'in tedavisinde faydalı bulunan fototerapi akciğer tüberkülozu ve raşitizm hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Aynı evrim süreçlerinin ardından güneş ışınlarının kullanımıyla başlanan tedavi girişimleri, daha sonraları yapay ultraviyole (UV) radyasyon kaynakları ile değiştirilmiştir. 20. yüzyılın ilk çeyreğinin

sonunda, fototerapi meşhur olup Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika şehirlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

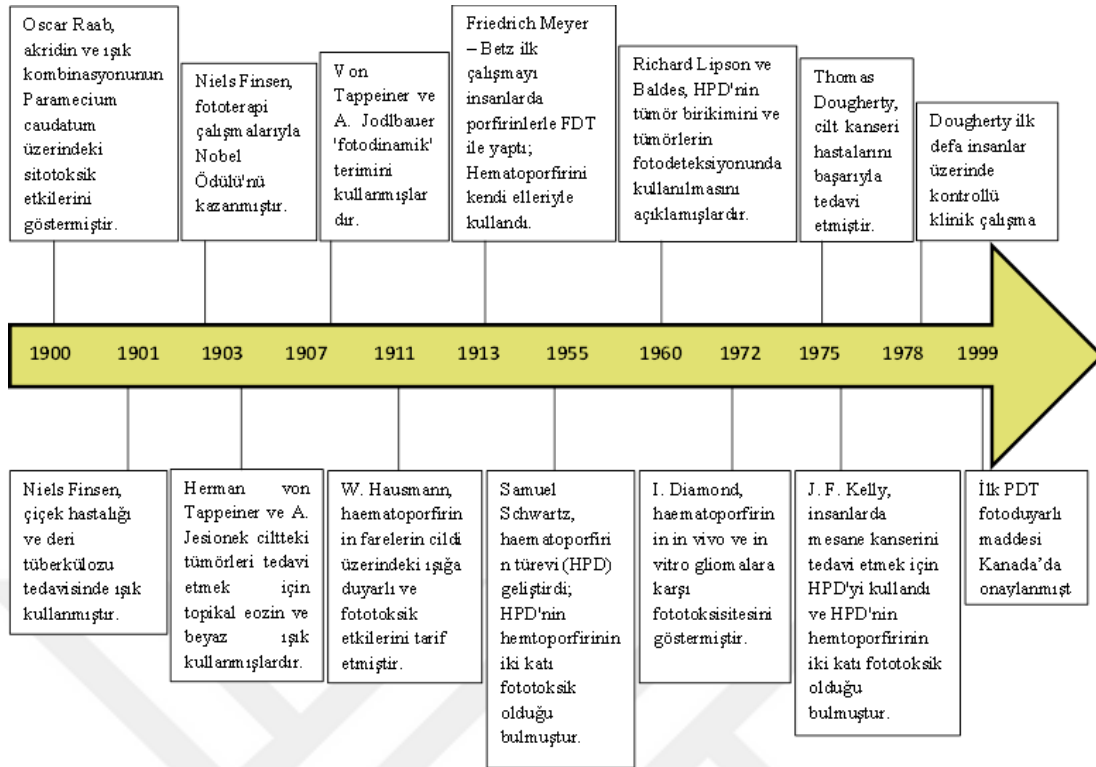
Modern fototerapinin temeline katkıda bulunan Danimarkalı Doktor Niels Ryberg Finsen (1860-1904), Lupus Vulgaris'i tedavi etmek ve çiçek hastalarında yara izini önlemek için hastaların güneş ışığında güneşlenmesini sağlayan bir tıp enstitüsüne sahipti. İlk denemelerinde doğal güneş ışığını kullanmıştır ancak kısa süre sonra yapay ışık kaynaklarına ya da filtrelenen güneş ışığına geçiş yapmıştır. 1893'te, çiçek hastalarının derisinin kırmızı ışıkla en iyi sonucu verdiğini fark etmiştir ve daha sonra 1903'te UV ışınlarının insan vücudu üzerine yararlı etkilerini göstermiştir. Bu durum yapay UV ışınları üretimindeki girişimlere yol açmıştır. İlk önce kuvars lens ve filtreleri içeren cihazları kullanarak UV'yi kızılötesi ve görünür radyasyondan ayırmıştır. Daha sonra lupus vulgaris tedavisinde karbon ark lambasından UV radyasyonu kullanmıştır. Bu buluşun sonucu, tıpta bir Nobel Ödülü olmuştur [69, 70].

Yüzyıllar içinde Mısır, Hindistan, Yunanistan, Çin'de yapılan bu çalışmalar fotodinamik terapi oluşumu için uygulama olmuştur. Oscar Raab 1900 yılında fotodinamik terapi çalışmasında hafif doza bağlı olarak Paramesium üzerinde toksik bir etki olduğunu bulmuştur. Paramesium'a düşük konsantrasyonlarda akrinin boyası verdiğini ve ardından görünür ışıkla kombinasyonu ile hızla öldüğünü göstermiştir. 1903 yılında ise Tappeiner ve Jesionek, üç cilt kanseri vakasını tedavi etmek için eozin boya ve ışık kullanmışlardır. Bu manada bu çalışma fotodinamik tedavinin ilk onkolojik çalışması olarak görülmektedir. 1950'lerde, Schwartz ve arkadaşları tarafından ilk etkili FDT ilacı olarak "hematoporfirin türevi" (HPD) olarak adlandırılan bir porifirin karışımı kullanılmıştır. Lipson ve arkadaşları tarafından 1960'larda tekrarlayan meme kanseri hastaları için HPD'nin terapötik kullanımı bildirilmiştir. 1978'de Daugherty ve arkadaşları Roswell Park Kanser Enstitüsü'nde hastaların kötü huylu tümörlerinin HPD enjeksiyonundan 24 ile 72 saat sonra güçlü kırmızı ışığa maruz bırakılarak başarılı bir şekilde tedavi edildiğini bildirmişlerdir. Bu prosedürü "Fotoradyasyon Tedavisi" olarak adlandırmış olsalar bile artık bu prosedür fotodinamik tedavi olarak adlandırılmaktadır. 1984 yılında, HPD'nin aktif

bileşeninin “diematoporfirin eter” (DHE) olduğunu tespit etmişlerdir. Ardından Dougherty ve arkadaşları, ilk ticari FDT ilacı olan Photofrin™ ‘i geliştirmişlerdir. Ark lambası ile başlayan çalışmalar, lazer, LED veya fiber optik sistemler kullanılarak hedef dokular için yeterli radyasyon dozunun sağlanmasını sağlamıştır [71, 72].

Nisan 1993’te Kanada Sağlık Bakanlığı tarafından FDT, mesane kanseri tedavisi için onaylanmıştır. Bu olay, bu tip kanser tedavisi için ilk onay olmuştur. Ancak FDT için en önemli olay Aralık 1995’te gerçekleşmiştir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), özofagus kanserinin bir FDT ilacı olarak palyatif tedavisi için Photofrin™’in kullanımını onaylamıştır.

İlerleyen yıllarda, Photofrin™-FDT, Amerika, Kanada, Japonya, Hollanda, Fransa’daki ilgili tıbbi kuruluşlar tarafından özofagus maligniteleri, mide kanseri, erken ve geç evre akciğer kanserleri, mesane kanseri ve jinekolojik maligniteler gibi bir veya birkaç patolojik durum için onaylanmıştır. Photofrin™ aracılı FDT’nin resmileşmesi ve birçok yeni fotosensitizerile birlikte, yaygın olarak mesane kanserleri, beyin kanserleri, meme metastazı, cilt kanserleri, kolorektal kanserler, aterosklerotik plakların çıkarılması, maküler dejenerasyon, aktinik keratoz gibi malign olmayan hastalıkların tedavisinde klinik FDT uygulamaları artmıştır [70, 73-76].



Şekil 2.39. Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi [73]

2.2.3. Fotodinamik terapi kuamı ve mekanizması

Fotodinamik terapi, kanser ve bazı malign olmayan hastalıkların tedavisi için klinik olarak onaylanmış bir tedavi türüdür. FDT, bir fotoduyarlı madde (FDM) veya ışığa duyarlı madde öncülünün (ön ilaç), hastaya sistemik veya topikal olarak uygulanmasının ardından hastalıklı bölgenin, fotoduyarlı maddenin absorbans bandına karşılık gelen dalga boyundaki ışık ile ışınlanması prosedürünü içerir [77]. Tedavi, tümör dokusunda seçici olarak biriken fotoduyarlı madde uygulamasının ardından, fotoduyarlı maddeye uygun bir dalga boyundaki ışığa maruz bırakılmasıyla; ışıkla uyarılmış fotoduyarlı maddeden elde edilen enerji, tekli oksijen (singlet oxygen) ve diğer yüksek reaktif oksijen türlerini (ROS) vermek üzere oksijene aktarılır. Işınlanmayla oluşturulan bu sitotoksik foto ürünler, kanser hücrelerinin zarar görmesine ve ölümüne neden olabilen bir dizi biyokimyasal olay başlatır [78]. Bu süreç genellikle doğrudan neoplastik hücrelerin öldürülmesini, tümör vaskülatörünün hasar görmesini, anti-tümör immün tepkisinin tetiklenmesini

ve lokal enflamatuvar reaksiyonların indüklenmesini içerdiğinden dolayı çok faktörlü niteliktedir [79].

Reaktif oksijen türleri normal işleyen organizmalar için zararlı aktif moleküller olarak bilinmektedir. Bu ajanlar, solunum gibi fizyolojik süreçler sırasında organizma tarafından üretilirler ancak moleküllerin aşırı derecede yüksek seviyede olması hastalıklarda, özellikle de iltihaplanma veya enfeksiyonlar sırasında ortaya çıkarlar. Düşük miktarda antioksidanlar ve çok yüksek serbest radikal seviyelerinde organizma oksidatif strese maruz kalır ve bu durum hücre tahribatına, DNA mutasyonu vb. gibi sonuçlara yol açmaktadır [80, 81].

Bu ajanların pozitif kullanımıyla birlikte tıp ve fotodinamik terapi gibi alanlarda daha bilinçli kullanılmaya başlanmıştır.

FDT'nin temel prensibi, bir dizi mekanizmadan kaynaklanan "öldürücü etki"dir. Temel olarak fotodinamik terapi, üç önemli bileşenin varlığını ve etkileşimini gerektirir:

1. Fotoduyarlı madde,
2. Fotoduyarlı maddeye uygun dalga boyundaki ışık,
3. Oksijen

Bu üç bileşene bakıldığında hiçbiri tek başına toksik değildir fakat bir araya geldiklerinde yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucunda fotokimyasal olaylar başlatmaktadırlar. FDT'nin en önemli iki yönü ışığı absorbe etme ve enerji transferleri süreçleridir. Temel enerji durumunda fotoduyarlı madde, düşük enerjili bir moleküler orbitalde zıt dönüşlere sahip iki elektronu bulunmaktadır, bu tekli hali olarak bilinir. Işığın fotonlar olarak absorpsiyonlanması takiben, bu elektronlardan biri yüksek enerjili bir yörüngeye yükselir ve uyarılmış tekli enerji seviyesinde (uyarılmış singlet) kalır [82]. Buradan flüoresans emisyonu veya ısı dağılımı ile temel durumuna geri dönebilir veya

sistemler arası geçiş yoluyla üçlü duruma (triplet state) dönüştürülebilir. Bu uyarılmış üçlü durumu daha sonra iki farklı reaksiyona girebilir:

1. Tip I: İncelenen dokuda düşük oksijen konsantrasyonu.

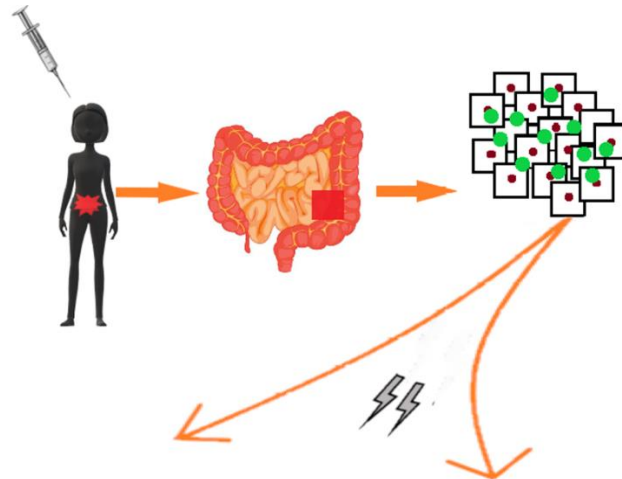
Tip I reaksiyonunda, uyarılmış üçlü durumdaki fotoduyarlı madde, hücre zarı veya molekülü gibi substrat ile doğrudan reaksiyona girebilir ve sırasıyla bir radikal anyon veya katyon oluşturmak üzere bir proton veya elektron transfer edebilir. Bu radikaller, reaktif oksijen türleri (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi) retmek için oksijenle reaksiyona girebilir. Bu reaksiyonlar sonunda biyolojik lezyonlar olarak ifade edilen oksidatif hasar üretir [79, 82, 83].

2. Tip II: İncelenen dokuda yüksek oksijen konsantrasyonu.

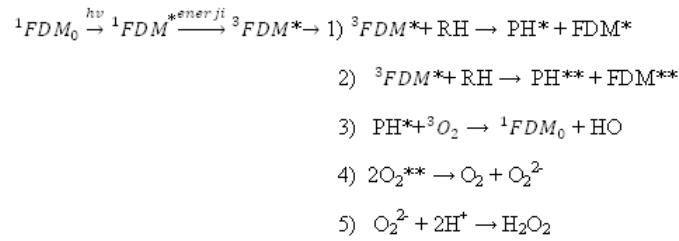
Tip II reaksiyonu, fotoduyarlı maddenin uyarılmış üçlü durumu ile temel durum moleküler oksijeni arasındaki enerji transferinden kaynaklanmaktadır; bu da ilk uyarılmış oksijen durumu, tekli oksijen, üretmektedir. Bu zwitteriyonik türler son derecede reaktif olup oksidatif hasara ve sonuçta hücre ölümüne neden olan çok sayıda biyolojik substratla etkileşime girebilir (şekil 2.4.) [84].

Hem Tip I hem de tip II reaksiyonları aynı anda gerçekleşebilir ve bu işlemler arasındaki oran kullanılan fotoduyarlı madde tipine, substrat ve oksijen konsantrasyonlarına bağlıdır.

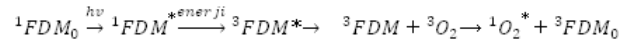
FDT sırasında Tip II reaksiyonlarının baskın olduğu ve tekli oksijenin biyolojik etkilerden sorumlu birincil sitotoksik madde olduğu genel olarak kabul edilmekle birlikte, Tip I reaksiyonları düşük oksijen konsantrasyonlarında veya daha polar ortamlarda daha önemli hale gelmektedir [79, 82, 83].



Tip 1:



Tip 2:



Şekil 2.4. Fotodinamik terapi mekanizması

2.2.4. Fotodinamik terapi etki mekanizmaları

Kanser tedavisi için hedeflenen fotodinamik terapide ölümcül sitotoksosite, ışığa duyarlaştırma işleminde istenen bir sonuçtur. Bu amaçta, oksijen varlığında, bir dizi olay doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikrovaskülatürde hasara ve lokal enflamatuvar reaksiyonun indüklenmesine yol açmaktadır. Fotodinamik terapide antitümör etkilerinin farklı mekanizmalarla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu mekanizmalar tümör hücreleri üzerinde doğrudan öldürücü etkiler, bölgeye kan akışını sınırlayan vasküler bozukluk ve immünolojik etkilerdir. Her bir terapötik ortamda hangi spesifik yola hakim olduğu, ışık dozu, fotoduyarlı madde, fotoduyarlı

maddenin konsantrasyonu ve hücre altı lokalizasyonu olmak üzere fotodinamik terapi parametrelerine bağlıdır [81,84,87].

2.2.4.1. Doğrudan hücre ölümü

Işığa duyarlılaştırma işlemiyle başlatılan ölümcül mekanizmalarda hücre ölümünün üç ana morfolojisi bulunmaktadır (Tablo 2.5.). Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim sırasında öngörülebilir bir yer ve zamanda meydana gelen genetik olarak kodlanmış bir intihar biçimi olarak tanımlanmaktadır. Gelişim sırasında morfolojik olarak ayırt edilen üç hücre ölüm şekli tanımlanmıştır: apoptoz, nekroz, otofaji. Tip I programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, çekirdek yoğunlaşması ve genel hücre küçülmesini içeren fenotipik değişikliklerle karakterize edilmiştir. Tip II programlanmış hücre ölümü, hücrenin lizozomal bağımlı sindirimi ve otofajik vakuollerin (otofagosomlar) varlığı ile ayırt edilirken tip III programlanmış hücre ölümü olan nekroz hücresel şişlik ve hızlı bir plazma membran bütünlüğü kaybı ile dikkat çekmektedir. Bu süreçler normal gelişim, doku homeostazi, anormal ve hasarlı hücrelerin yok edilmesinde önemli rol oynadığı bilinen hücre programlarıdır.

Apoptotik hücre ölümü en yaygın fizyolojik, patolojik ve terapötik role sahip programlı hücre ölümü olduğu düşünülmektedir. Hücre ölümünü geri döndürülemez ve geniş ölçüde korunmuş yol olup bu yol ilk kez 1991 yılında fotodinamik terapiye yanıt olarak tanımlanmıştır [86, 87].

Apoptoz, kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın internükleozomal fragmanlara bölünmesi, hücre çekmesi, membran sızıntısı, plazma membran bozulması olmadan apoptotik cisimlerin oluşumu, komşu hücreler tarafından fagositoz ile morfolojik olarak karakterize edilen ve ATP gerektiren bir süreçtir. Biyokimyasal düzeyde apoptoz, insanlarda 11 üyesi tespit edilen kaspazların aktivasyonunu gerektirir. Tüm kaspazlar proenzimler veya zimojenler olarak sentezlenir ve başka bir apoptotik sinyale yanıt olarak başlatıcı kaspaz veya efektör kaspaz tarafından aktive edilir. Apoptoz, reseptör sinayalini içeren dışsal bir yolla ve

mitokondri için merkezi bir role sahip olan içsel bir yolla aktive edilebilir. Her iki yol da kaspaz aktivasyonunun kritik aşamasında birleşir. Dışsal yol, ilgili ligandların hücre ölüm reseptörlerine (örneğin Fas, TNF-RI, TRAIL reseptörü) bağlanmasıyla tetiklenir. Oluşan bu reseptör trimerik yapı kazanarak adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek ölüme neden olan sinyal kompleks (DISC) oluşumunu indükler. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8/-10 proteolitik bölünme ile aktive olur. Aktif kaspaz -8/-10, apoptoza yol açan efektör prokaspaz-3/-7'yi aktive eder.

Fotodinamik kaynaklı yolda dışsal yol baskın değildir. Fotodinamik terapi ile indükelenen apoptozda baskın olan yol, içsel yoldur. Apoptozun iç yolunda mitokondri merkezi bir yol oynar. Her ne kadar da mitokondri ATP formunda metabolik enerji üretilmesi için yaşamsal bir organeldir ancak sinyalleme yollarını harekete geçiren sayısız içsel ve dışsal hücre ölümü uyararı, mitokondriyal zarların geçirgenliğini uyarmak için mitokondri üzerinde birleşir. Mitokondriyal membran geçirgenliği, mitokondriyal membran boşluğunda depolanan birkaç apoptojenik proteinlerin sitozole salınımını sağlar. Bu olay sitokrom c salınımında sonra birçok hücre ölüm programında geri dönüş olmadığı ileri sürülmüştür. Apoptozda şu ana kadar belirgin bir rolle tanımlanan mitokondriyal membran boşluğu proteinleri sitokrom c, Omi/HtrA2 (Omi stres düzenlenmiş endoproteaz/yüksek sıcaklık gereksinimi protein A2) ve Smac/DIABLO gibi kaspazatörlerin yanı sıra kaspazdan bağımsız bir şekilde etki gösteren apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G (Endo G) gibi aktivatörler bulunur.

Sitozolik sitokrom c, Apaf-1'e (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) bağlanarak ATP veya dATP varlığında apoptozom denilen bir heptamerik kompleks oluşumu yoluyla prokaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar. Stozolde serbest kaldıktan sonra, Omi/HtrA2 ve Smac/DIABLO, endojen kaspaz inhibitörlerinin (IAP) aktivitesini inhibe eder ve böylece kaspaz aktivasyonunu teşvik eder. AIF ve EndoG ise çekirdeğe transloke olur ve kaspaz sinyallerinden bağımsız olarak kromatin yoğunlaşmasına ve büyük ölçekli DNA fragmentasyonuna neden olurlar [87, 86].

Mitokondriyal dış zar bütünlüğü B hücresi lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Bu proteinler apoptozun merkezi düzenleyicileridir ve fonksiyonel olarak antiapoptotik ve proapoptotik proteinlere bölünebilir. Çoğu Bcl-2 üyesi, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) ve çekirdek gibi hücre içi organellerin zarlarını hedeflemeye önemli bir rol oynar. Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 ve Mcl-1), proapoptotik proteinlerin (örn., Bax ve Bak) aktivasyonunu bloke eder ve sonuç olarak mitokondriyal dış zar permeabilizasyonunu (MOMP) inhibe eder. Bid ve Bim gibi yalnızca BH3 alan adı üyeleri, korunmuş dört BH alanının BH3 motifine sahiptir. Antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin doğrudan bağlanması ve inhibisyonu veya Bax ve / veya Bak'ın doğrudan aktivasyonu ile apoptozu kolaylaştırırlar. Apoptotik sinyalizasyon üzerine Bax ve Bak, Bax'ın mitokondriyal hedeflenmesine ve Bax ve Bak'ın homo-oligomerizasyonuna yol açan konformasyonel değişikliklere uğrar. Bu oligomerler, apoptojenik proteinleri iç ve dış mitokondriyal membranlar arasındaki boşluktan serbest bırakarak kaspaz aktivasyonuna yol açarlar.

Mitokondri ve/veya endoplazmik retikuluma lokalize edilmiş fotoduyarlı maddeleri aktive ederek yüksek ROS ve Ca^{+2} seviyeleri, transglutaminaz 2'ye bağlı bir mekanizma yoluyla kaspaza bağımlı ve AIF aracılı apoptotik hücre ölümüne neden olur [88].

Otofaji, gelişim ve homeostazda önemli bir rol oynayan korunmuş bir hücresel geri dönüşüm mekanizmasıdır. Otofaji, besin yoksunluğu sırasında protein sentezi için elementler sağlamak üzere aktive edilir ve ayrıca katlanmış veya toplanmış proteinleri ve hasarlı organelleri (ER ve mitokondri vb.) parçalamak için kullanılır. Normal fizyolojiye dahil olmasının yanı sıra otofaji, nörodejenerasyon ve kanser gibi hastalıklarda da rol oynamaktadır. Tip II hücre ölümü olarak da bilinen otofaji, uzun ömürlü proteinleri ve organelleri ortadan kaldırmak için anahtar hücresel mekanizmadır. Genel olarak üç tip otofaji vardır: makro otofaji, mikro otofaji ve şaperon aracılı otofaji. Otofaji, endozomlar, lizozomlar ve apoptoz sonrası oluşan kalıntılar gibi diğer veziküllerden farklı olan ve otofagozomlar olarak adlandırılan

çift membranlı kapalı veziküllerin ortaya çıkmasıyla diğer hücre ölüm modlarından morfolojik olarak ayırt edilebilir [81, 88].

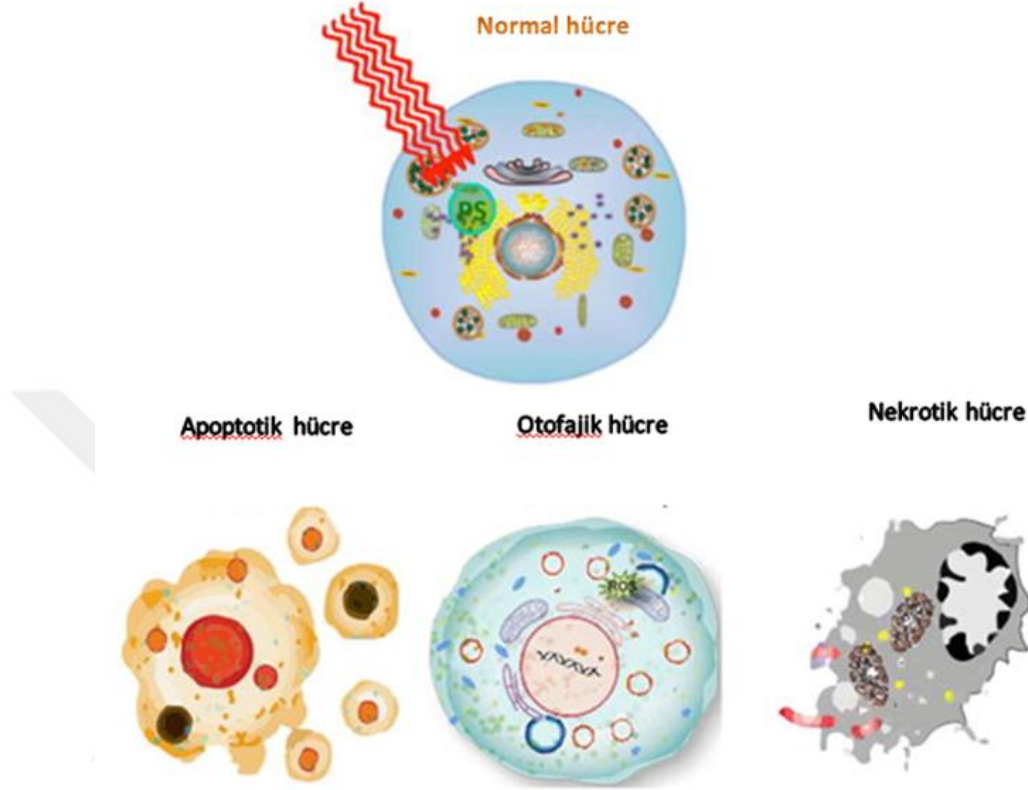
Otofagosomlar, ER, mitokondriyal dış zar veya plazma zarından türetilen bir çift membranın uzaması ve füzyonu ile otofagosom oluşum bölgesinde otofajinin başlangıç aşamasında oluşur. Ortaya çıkan otofagozomlar, hücresel bileşenlerin ve organelerin asidik lizozomal enzimler tarafından ayrıştığı otolizozomlar üretmek için lizozomlarla birleşir. Bu süreçler otofajiye bağlı (Atg) gen ailesi proteinleri tarafından kontrol edilir ve en iyi çalışılan otofaji türü olan makro otofajinin karakteristiğidir [88].

Fotodinamik tedavide otofajinin “çift yüzlü” rolü bulunmaktadır: hücrenin hayatta kalmasını veya hücre ölümünü teşvik eder. Hücre sağkalımına destek olduğundan otofaji fotodinamik terapiye karşı savunma sistemi olarak kabul edilir [81].

Nekroz, morfolojik olarak sitoplazmanın vakuolizasyonu, plazma zarının şişmesi ve parçalanması, hücresel içeriklerin ve proenflamatuar moleküllerin salınmasına bağlı olarak enflamatuar bir reaksiyona neden olur. Bununla birlikte nekroz, uzun zamandır pasif, programlanmamış bir ölüm yolu olarak tanımlansa da, son çalışmalar nekrotik hücre ölümünün bir sinyal iletim yolunun bir parçası olarak aktif olarak yayılabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, TNF- ve Fas reseptörlerinin belirli hücre hatlarına girmesi, kaspaz inhibisyonu koşulları altında RIP1 (reseptörle etkileşen protein 1) kinazın aktivasyonu yoluyla nekrozu tetiklemektedir. Ayrıca RIP1'in, oksidatif stres hasarını takiben poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) tarafından aktive edilen JNK aracılı nekrotik kaskadın önemli bir elemanı olduğu ileri sürülmüştür [86].

Kaynaklar, apoptozun nekroza kaymasının mümkün olduğunu ve fotoduyarlı madde dozuna bağlı olduğunu söylemektedir. Işık, oksijen ve fotoduyarlı madde sınırlayıcı olmadığında (yüksek doz FDT) nekroz veya apoptoz olayları gerçekleşebilmektedir. Bileşenlerden birinin eksik olması durumunda (düşük doz FDT), tedavi hücreleri,

spesifik moleküler yolların aktivasyonu yoluyla apoptoz, otofaji ve gücre yaşlanması gibi farklı hücre ölüm yolları ile karşılaşabilir [81].



Şekil 2.5. Hücre ölüm şekilleri [89]

2.2.4.2. Vasküler mekanizmalar

FDT tedavisinin vasküler mekanizması, özellikle kanser tedavisi durumunda umut vericidir. Bu yaklaşım daha etkilidir, tümör hücrelerine erişilmesi daha kolaydır ve geleneksel hücre hedefleme yaklaşımlarına kıyasla ilaç direnci geliştirme olasılığı daha düşüktür. Kanser tedavisi durumunda vasküler mekanizmanın temel amacı tümör vasküler kapanmasını indükleyerek maksimum hücre öldürmektir. Vasküler hedefleme, FS'nin vasküler sisteme bölgeye yönelik olarak verilmesine ve ardından bölgeye özgü vasküler ışığa duyarlılaştırma etkilerini indüklemek için hafif ışılamaya dayanır. Yapılan çalışmalar, vasküler hedefleme FDT'sinden sonra mikrosirkülasyon disfonksiyonu, trombüs oluşumu nedeniyle damar tıkanıklığı, mekanik kompresyon ve vazoaaktif maddelerin neden olduğu damar yapımı ya da

çöküşü meydana gelebilmektedir. Mevcut literatüre göre ışığa duyarlılaştırma, reaktif oksijen türleri aracılı bir mekanizma yoluyla endotelial hücrelerde nükleer transkripsiyon NF-kB'yi aktive eder. Endotelial hücrelerde NF-kB'nin aktivasyonu, vasküler etki gösteren foto duyarlı madde kaynaklı tümör mekanizmasında önemli bir rol oynar. Tümör inhibisyonu, sitokinlerin, adezyon moleküllerinin ve ısı şoku proteinlerinin gen ekspresyonunu arttırmadaki rolü ile ilgilidir. Sonuç olarak vasküler FDT, vasküler hasara neden olan kan hücrelerini uyarabilmektedir [83]. Tümör hücrelerine benzer şekilde vasküler sistem, uygun ışık koşulları altında serbest radikaller oluşturan fotoduyarlı maddeleri de biriktirebilir. Vasküler duvarlardaki değişiklikler, oksijen konsantrasyonunun azalmasına ve vasküler hücrelerin ve yakındaki tümör hücrelerinin nekrozuna yol açar. Ayrıca, bu olay sırasında üretilen yüksek düzeyde toksinler, tümör için gerekli olan vaskülatürün çökmesine yol açabilmektedir. Bilimsel kaynakların belirttiği gibi bu durumda hem apoptoz hem de nekroz oluşabilir. Oluşan toksik maddeler, kan eksikliği ve hiperoksi kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlamaktadır [81].

Tümör hücrelerine benzer şekilde vasküler sistem, uygun ışık koşulları altında serbest radikaller oluşturan fotoduyarlı maddeleri de biriktirebilir. Vasküler duvarlardaki değişiklikler, oksijen konsantrasyonunun azalmasına ve vasküler hücrelerin ve yakındaki tümör hücrelerinin nekrozuna yol açar. Ayrıca bu olay sırasında üretilen yüksek düzeyde toksinler, tümör için gerekli olan vaskülatürün çökmesine yol açabilmektedir. Bilimsel kaynakların belirttiği gibi bu durumda hem apoptoz hem de nekroz oluşabilir. Oluşan toksik maddeler, kan eksikliği ve hiperoksi kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlamaktadır [84, 87].

2.2.4.3. İmmünolojik mekanizma

Fotodinamik tedavi bağışıklık sistemi ile yakından bağlantılıdır. Bağışıklık sistemi FDT, immün yanıtı ve düzenlemeyi artırabilir. FDT tümörlerin ve vaskülatürlerinin nekrozunu indüklediğinde, bir immün kaskadı da başlatılır ve enflamatuar yanıt oluşturur. FDT sırasında ortaya çıkan serbest radikaller ve oksidatif stres, stres kaynaklı proteinlerin üretilmesinden, hücrede apoptozu düzenleyen genlerin

aktivasyonundan ve sitokin gen ekspresyonundan sinyal iletimine yol açar. Bu salım, tedavi bölgesinde birleşen nötrofiller ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli beyaz kan hücrelerini aktive eder. Daha sonra makrofajlar, FDT hasarlı kanser hücrelerini fagositize eder ve bu tümörlerden proteinleri CD4 yardımcı T lenfositleri salgılanarak CD8 sitotoksik T lenfositlerini aktive eder. Bu bağışıklık reaksiyonu sadece FDT bölgesinde meydana gelmekle kalmaz, aynı zamanda bölgesel ve uzak lenfatik dokuda da ortaya çıkabilir. Bu sitotoksik T hücreleri sadece nekroza neden olmakla kalmayıp aynı zamanda FDT tamamlandıktan sonra bile tümör hücreleri bulunduğu apoptotik yollara neden olabilir [81, 84].

	Organeller	Mekanizma
Direkt hücre hasarı	Mitokondri: -Sitokrom c'yi serbest bırakma -Bcl-2 hasarı	Apoptoz
	Sitoplazma: -NFκB hasarı	
	Endoplazmik retikulum: -Beclin 1 -mTOR aktivasyonu	Otofaji
	Hücre zarının parçalanması	Nekroz
Vasküler etki	Oksijen ve besin maddelerinin lokal tükenmesi	Apoptoz Nekroz Otofaji
İmmünolojik etki	Sitotoksik T hücreleri	Granzim aracılı apoptoz

Şekil 2.7. Fotodinamik terapinin etki mekanizmaları [90]

2.3. Fotodinamik Terapide Fotoduyarlı Maddeler

Fotoduyarlı madde aktif hale gelebilmek için ışığı absorbe etmelidir. Bu nedenle ışığın, fotoduyarlı maddenin absorpsiyon spektrumunda yer alan dalga boylarında olması gerekir. Aynı zamanda ışığın dokuya derinlemesine nüfuz etmesine izin veren elektromanyetik spektrumun 600-900 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon katsayıları

göstermelidir. İdeal bir fotoduyarlı madde, güçlü seçici fototoksik etki ve aktif oksijen formları üretme kabiliyeti ile tanımlanmış bir kimyasal bileşik olmalıdır. Hem fotoduyarlı maddeler hem de reaktif oksijen türleri çok kısa yarı ömürlere sahiptir. Fotodinamik terapide etkili olması için her ikisinin moleküllerinin biyolojik olarak önemli hücresel yapılara çok yakın olmaları gerekir. Hızlı temizleme ve uygun absorpsiyon, dağılım, metabolizma, boşaltım parametreleri de son derecede önemlidir. Böyle birçok özelliğe sahip bileşiğe olan ihtiyaç, çok sayıda fotoduyarlı madde sentezlenmesine yol açmıştır. Fotoduyarlı maddelerin farmokinetiği, hücre içi lokalizasyonu ve sitotoksik etkisini belirleyen kimyasal yapıları birbirlerinden farklıdır [91, 92]. İdeal bir fotoduyarlı maddenin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

1. Yüksek derecede kimyasal saflık derecesi,
2. Oda sıcaklığında stabilite,
3. Karanlıkta minimal toksisite,
4. Sadece belirli bir dalga boyunda ışığa duyarlı efekt,
5. Vücut dokularında kolay çözünürlük,
6. Ucuz, basit sentez ve kolay kullanılabilirlik,
7. Absorpsiyon bantları melatonin, hemoglobin veya oksihemoglobin gibi endojen boyalar dahil olmak üzere vücuttaki diğer maddelerin absorpsiyon bandıyla çakışmamalıdır.

Boyalar, ilaçlar, kozmetikler, kimyasallar ve birçok doğal madde içeren ışığa duyarlılık özelliklerine sahip 400'den fazla bileşik bilinmektedir. Genel olarak kullanılan ve araştırılan fotoduyarlı maddelerin en önemlileri iki grupta sınıflandırılabilir: porfirinler ve bunların türevleri klor ve ftalosiyaninler, porfirin olmayan fotoduyarlı maddeler ki bunlarda 5-aminolevulinik asit, ksantanlar, fenotiyazinlar, triarilmetanlar, kurkumin ve hiperisin'dir.

Porfirin ailesi üç kuşaklara ayrılabilir: birincisi 1970 ile 1980 arasında geliştirilen fotoduyarlı maddeleri ifade eder ve hematoporfirin türevi (HpD) ve Photofrin® içerir (Tablo 2.5.) [83]. Hematoporfirine (Hp) kıyasla HpD, tümörler için daha iyi ibr doku

seçiciliği ve deride daha az ışığa duyarlılık potansiyeli göstermiştir. Daha sonra, HpD'den izole edilmiş porfirin dimerleri ve oligomerlerin bir karışımı "Photofrin" ticari ismi altında temin edilmiştir. Genel olarak sodyum porfimer olarak da bilinen Photofrin, en sık kullanılan fotoduyarlı madde olarak kalmıştır. FDT'deki geniş uygulamalara rağmen; 60 molekülden daha fazlasına sahip kimyasal karışım nedeniyle zayıf kimyasal saflık, ciltte uzun yarı ömürlü ve yoğunluğu nedeniyle cildin aylarca ışığa duyarlı olması, düşük molar zayıflama katsayısı ve aktive olma dalga boyları iyi bir penetrasyon için kısa olması nedeniyle klinik kullanımda sınırlamalara yol açmıştır. Birinci nesil fotoduyarlı maddelerin bu dezavantajları yeni bileşiklerin araştırılmasına ve ikinci nesil fotoduyarlı maddelerin geliştirilmesine neden olmuştur.

Tablo 2.5. Birinci nesil fotoduyarlı maddeler [83]

Birinci nesil fotoduyarlı maddeler
Hematoporfirin
Hematoporfirin türevi - Photofrin™ (porfimer sodyum)

İkinci nesil fotoduyarlı maddeler ise birinci ve üçüncü neslin sınırlamalarının kaldırılması amaçlanan porfirin türevlerini içerir. İkinci nesil fotoduyarlı maddeler antikorlar ve diğer biyolojik hedefleme molekülleri ile konjuge edilmiş ajanları kapsamaktadır (Tablo 2.6.). İkinci nesil fotoduyarlı maddeler, 650-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorpsiyonları, derin dokulara daha iyi penetrasyon, yüksek kimyasal saflık ve tekli oksijen oluşumu verimi gibi özellikleri ile karakterize edilmişlerdir. Yüksek seçicilik ve daha hızlı bir şekilde elimine edilmesinden dolayı daha az yan etki yaratırlar. İkinci nesil fotoduyarlı maddelerin temel dezavantajı ise intravenöz uygulamalarında önemli derecede sınırlayıcı faktör olan ve yeni ilaç dağıtım yöntemlerine araştırmaya sebep olan sudaki çözünürlükleridir.

Tablo 2.6. İkinci nesil fotoduyarlı maddeler [83]

İkinci nesil fotoduyarlı maddeler	
Metalloporfirinler:	Lutrin
Klorlar:	N-aspartil klor e-6 (Npe6) Benzoporfirin türevi-BPD
Porfeni:	N-propil porfeni Kloralüminyum ftalosiyenin(AIPcCl)
Ftalosiyeninler:	CASpC Çinko ftalosiyenin Silikon naftalosiyenin (Pc4)
Protoporfirin:	Levulan, Metvix
Purpurinler:	Tin Etiopurpurin-SnET2 Purlitin
Klorofil türevleri:	Feohorbid a

Üçüncü nesil fotoduyarlı maddelerin geliştirilmesi, çevredeki sağlıklı dokulara verilen zararı azaltan ve tümör dokusuna daha yüksek afiniteye sahip maddelerin sentezine dayanmaktadır. Bu hedefleme yaklaşımları, üçüncü nesil fotoduyarlı maddelerin bugüne kadarki en umut verici sonuçlara yol açmıştır. İlacın seçiciliğini artırmak için, FDT'nin bazı modifikasyonları kullanılmaktadır:

1. İkinci nesil fotoduyarlı maddelerin hedef alıcıya odaklanmış moleküler kombinasyonları,
2. Proliferatif tümör hücrelerinin hücre duvarlarının sentezi için daha fazla kolestrole ihtiyaç duyması nedeniyle LDL lipoproteinli fotoduyarlı maddelerin kombinasyonları,
3. Fotoduyarlı maddenin, kanser hücresine spesifik antijenine yönlendirilmiş monoklonal antikorla konjugasyonu,
4. Büyüme faktörü reseptörleri, hormonlar gibi tümör yüzey markörlerinin kullanılması gibi çözümler seçiciliğin artmasına ve etkilenen bölgelerde fotoduyarlı maddelerin daha fazla biriktirilmesine izin vererek ilaç dozlarını azaltma olanağı sunmaktadır [93].

Tablo 2.7. Porfirin olmayan fotoduyarlı maddeler [83]

Porfirin olmayan fotoduyarlı maddeler	
Siyaninler	Merosiyanın540 Katyonik siyaninler
Fenotiyazinyum boyalar	Metilen Mavisi Toludin mavisi Nil mavisi
Azadipirometan (ADPM)	ADPM türevle
Psoraleans	Dimetilaminobenzoik furocoumarin
Antrasiklinler	Daunorubisin, Doksorubisin

Günümüze kadar klinik FDT için porfirin sodyum (Photofrin®), 5-aminolevulinik asit (ALA, Levulan®) ve metil esteri MAL (Metvix®), temoporfin (Foscan®), verteporfin (Visudyne®) fotoduyarlı maddeleri onaylanmıştır [92, 93].

Tablo 2.8. Klinik olarak kabul edilmiş fotoduyarlı maddeler

Ticari Adı	Fotoduyarlı Madde	Yapısı	Uyarıldıkları Dalga Boyu λ (nm)	Onaylı Uygulamalar ve Ülkeler
Levulan	5-Aminolevulinik asit (ALA)	Profirin öncüsü	635	Aktinik keratoz (Kanada, ABD)
Metvix, Metvixa	Metil ester 5-ALA	Profirin öncüsü	635	Aktinik keratoz (Kanada, ABD)
Photofrin	Porfirin sodyum (HpD)	Profirin	630	Bazal hücreli cilt kanseri (AB), Skuomöz hücreli karsinom in situ (AB), Mesane kanseri (Kanada), Rahim ağzı kanseri (Japonya), Yemek borusu kanseri ve displazi (Kanada, AB, ABD, Japonya), Mide kanseri (Japonya), Akciğer kanseri (Kanada, AB, Japonya, ABD)
Foscan	Meta-tetrahidroksifenilklorin (m-THPC)	Klorin	652	Baş boyun kanseri (AB)
Laserphyrin	Taporfin sodyum (Talaporfin)	Klorin	664	Akciğer kanseri (Japonya)
Fotolon	Klorin e6+ polivinilpirolidon	Klorin	660	Deri, vulva, serviks, ağız kanseri (Rusya)
Fotodizatin	Klorin e6+ klorin p6	Klorin	660	Deri kanseri (rusya, Güney Kore)
Photosense	Alüminyum sülfanat ftalosiyanın	Ftalosiyanın	675	Deri, vulva, oral, yemek borusu ve mide; meme metastazi (Rusya)

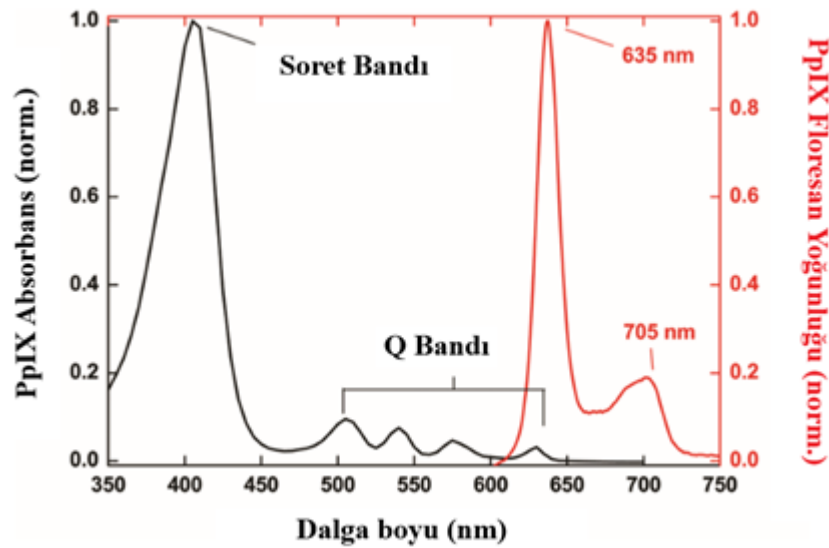
2.3.1. Aminolevulinik asit

Aminolevulinik asit (ALA), çeşitli malignitelerde katı tümörlerin fotodinamik tespiti ve fotodinamik tedavisi için potansiyel uygulamalara sahip bir fotoduyarlı madde [95] olup sadece hayvanlarda değil, aynı zamanda bitki mitokondrisinde de biyosentezlenen doğal bir amino asittir. 5-aminolevulinik asit kullanılarak yapılan fotodinamik tedavi, kanser hücrelerinde aşırı miktarda biriken protoporfirin IX (PpIX) flüoresan maddesinin, gözle görülebilir kırmızı veya yeşil ışık ışınımı ile uyarıldıktan sonra reaktif oksijenin üretildiği ve kanser hücrelerini ölüme sürükleyen bir tedavi yöntemidir [80]. Düşük toksisiteye sahiptir, kansere özgüdür ve hızla ABCG2 gibi aktif taşıyıcılar kullanarak normal hücreler tarafından metabolize edilerek atılır [98]. ALA, hemoglobin biyosentezi yolunda doğal olarak oluşan ilk ve hız sınırlayıcı bir ara madde olup genellikle glisin ve süksinil CoA arasındaki kondenzasyon reaksiyonunda mitokondride sentezlenir. Memelilerde iki ALA sentaz (ALAS) izoformu tanımlanmıştır; ALAS1 ve sadece eritrosit öncüllerinde ifade edilen ALAS2. Bununla birlikte, ALA metabolizması, insan vücudundaki hemen hemen tüm dokularda ALAS1 ile gerçekleşmektedir.

PpIX, tümör hücrelerinin mitokondrisinde toplanan ve ışığa maruz kaldıktan sonra tümör hücrelerinde hasara yol açan güçlü bir ışığa duyarlaştırıcıdır. Hem biyosentetik yolağın katılan tüm enzimler gerekli olmakla birlikte bunlardan ALA1 ve ferroşelataz enzimleri hız sınırlayıcı enzimler olarak kabul edilmektedir. Ferroşelataz, PpIX'un heme dönüştürülmesinden sorumludur. Normal olarak ALAS1'in aktivitesi negatif geri besleme mekanizması vasıtasıyla hem ile düzenlenmektedir. Hem, ALAS'ın mitokondriyal hedefleme sırasındaki hem düzenleyici motifine (HRM) bağlanır ve bu nedenle ALAS1 öncüsünün mitokondriye taşınmasını önler. Geri bildirim mekanizması, PpIX'un ferroşelataz tarafından verimli bir şekilde heme dönüştürebilecek miktarlarda üretilmesine yol açmaktadır. ALA'nın ekzojen uygulaması, ALA sentezine uygulanan doğal düzenlemeyi atlar ve bu da PpIX'un üretimini artmasına neden olur. Ferroşelatazın etkinliği, aşırı miktarda üretilen PpIX'un heme dönüştürülmesi için çok düşüktür ve bu hücrelerde PpIX birikmesi ile sonuçlanmaktadır. ALA uygulamasından bir zaman

sonra, PpIX sentezlendiğinde, hedef hücrelerin ışığa maruz bırakılması ve ışığa duyarlı hale getiricinin uyarılmasıyla birlikte sitotoksik etkiler yapan reaktif oksijen oluşumuna yol açmaktadır [92, 95, 97].

PpIX, beş absorpsiyon tepe dalga boyuna sahiptir: 410 nm, 510 nm, 545 nm, 580 nm ve 630 nm [98]. 410 nm dalga boyu en büyük absorpsiyon katsayısı olmasına rağmen düşük bir doku penetrasyonuna sahip olduğu için genellikle FDT için 635 nm dalga boyundaki kırmızı ışık kaynağı veya 410 nm dalga boyu etrafındaki mavi ışık kullanılmaktadır [99-101].



Şekil 2.7. PpIX'un absorpsiyon bantları [98]

ALA'nın fotodinamik teşhis ve tedavi için kullanımı yaklaşık 30 yıl önce başlamıştır ve çalışmalar, araştırmalardan tedaviye şeklinde ilerleyip uygulanmıştır. Kötü huylu tümörlerin fotodinamik teşhis ve tedavisi için fotoduyarlı madde olarak 5-ALA ilk kez 1987'de rapor edilmiştir [102]. Bilim insanları, bu çalışmada ALA tarafından üretilen endojen porfirinin fotoaktivasyonu ile eritrolösemik hücrelerin yıkımını araştırmışlardır. 1990'da Kennedy ve arkadaşları tarafından dermatoloji alanında, topikal olarak uygulanan 5-ALA FDT çalışması ilk kez yapılmıştır [103]. 1993 sonrasında birçok grup tarafından ALA araştırması yapılmıştır [104]. Bu şekilde ALA'nın tanı ve tedavi kullanımı geliştikçe, yüksek dalga boylarında (650-740 nm)

absorbans spektrumları olan yeni nesil ışığa duyarlılaştırıcılar, daha derin doku penetrasyonuna izin vermiş ve klinik kullanım genişlemesini sağlamıştır [95].

Tablo 2.9. ALA ile yapılmış bazı in vitro çalışmalar

Uygulama	Fotoduyarlı Madde	Radyasyon	Referans
FADU	ALA	635 nm, 100 mW/cm ²	
A172			[105]
SW480-SW620	ALA	600-720 nm, 10, 30, 60 J/cm ²	[106]
Equine sarkoid(Cilt kanseri)	ALA, çeşitli üreticiler	10 J/cm ² – 32 mW/cm ²	[107]
SW480-SW620	ALA	600-720 nm, 10 J/cm ²	[108]
WiDr	ALA	Beyaz ışık, 30 mW/cm ²	[109]
SW480, SW620	ALA (CoCl ₂)	600-720 nm, 10, 30, 60 J/cm ²	[110-112]
SW480, SW620	ALA (CoCl ₂)	600-720 nm, 10 J/cm ²	[113, 114]
SW620	ALA, met-ALA	630±20 nm, 4.5 J/cm ²	[115]
U-118, U-251, DLD-1, H-1299, H460, Hs578T, MDA-MB-251	ALA (MEK inhibitörü U0126/ DMSO)	618-630 nm, 27 J/cm ² , 150mW/cm ²	[116]
H1299, A549, HCT-116	ALA (ABCG2 inhibitörü Ko143)	630 nm, 0-20 J/cm ²	[117]

ALA'nın fotodinamik teşhis ve tedavisi, Avrupa ve Avustralya'da daha kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve pazarlanmış olup burada ALA'nın metil-ester türevleri (Photocure, Norway ve Galderma, Fransa tarafından sağlanan Metvix®) bazal hücreli karsinom ve aktinik keratoz tedavisi için onaylanmıştır. Avrupa İlaç ajansı mesane kanserinin endoskopik fotodinamik teşhisinde tanısal uygulama için ALA'nın heksil ester türevini (Hexvix®) ve rezidüel malign gliomanın intraoperatif fotodinamik teşhisi için (Gliolan®) 5-ALA'yı onaylamıştır. ALA'nın Amerika

Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayı dermatolojik, malign glioma ve ürogenital uygulamalarla sınırlı kalmaktadır. Diğer tüm klinik endikasyonlar klinik çalışmalarda yapılan araştırma prosedürlerini içermektedir [91, 95].

ALA diğer fotoduyarlı maddelere göre birçok avantaja sahiptir:

1. Önceden oluşturulmuş foto duyarlı maddeler vücuda verildiklerinde, vücut onları yabancı madde olarak kabul eder ve bu manada bu maddelerin atılım süresi belli değildir. PpIX vücutta doğal olarak bulunan tek porfirin olduğu için kişinin dokusunda anormal derecede yüksek PpIX seviyeleri geçici olarak uyarıldığında doğal kontrol mekanizmaları devreye girerek bunun elimine edilmesini sağlamaktadır. Bu yüzden insan vücuduna uyumluluğu bakımından avantajlı olmaktadır.
2. PpIX, biyosentetik yolla üretildiği için vücudun daha fazla ALA'yı PpIX'e dönüştürmeyeceği doğal maksimum veya eşik konsantrasyonu vardır. Bu nedenle uygulanan ALA konsantrasyonunun önceden oluşturulmuş fotoduyarlı maddelere kıyasla kontrol edilmesi kritik bir önem arz etmez; çünkü ALA nispeten toksik değildir ve biyokimyasal olarak indüklenen PpIX konsantrasyonu kendi kendini sınırlamaktadır.
3. PpIX bilinen en fazla fotolabil (ışığa karşı dayanıksız) porfirinden biridir. ALA-FDT'nin seyri sırasında PpIX molekülleri üretilen tekli oksijenin bir kısmı ile reaksiyona girer ve artık ışığa duyarlı hale gelmeyen ve oldukça farklı bir absorpsiyon spektrumuna sahip olan ürün veya ürünlere dönüştürülebilir.

Bunun da klinik açıdan bir çok önemi vardır:

1. PpIX, optik filtre olarak işlev görür ve PpIX'u absorbe edebilecek tüm dalga boylarını tarayabilir. PpIX'un kalın bir tümörün üst katmanlarında bulunması, bu dalga boylarının bazılarının derin katmanlara ulaşmasını önleyecektir. Flora ışıldama bozulması, optik etkisini yok eder ve böylece hedef dokunun ışığı ile daha derin penetrasyon sağlar.

2. Flora ışıldaama bozulması yaşayan PpIX artık fotoduyarlı madde değildir. Tedavi sırasında normal hücrelerde biriken az miktardaki PpIX, normal dokulara hasar vermeden çok önce ışık tarafından etkisizleştirilir. Fotoışıldaama bozulması içermeyen bir fotoduyarlı madde, daha derinleri tahrip etmeye başladığında normal dokularda fototoksik hasara neden olma süresini arttırabilir.
3. ALA hem topikal hemde sistemik olarak uygulanabilmektedir.
4. ALA-FDT kullanımı kolaydır ve hem ışık dozu hem de ilaç dozu için geniş bir güvenlik marjına sahiptir [91].
5. ALA, topikal kullanım için kaydedilmiş, özellikle yüzeysel cilt lezyonlarının lokal tedavisi için faydalı olan tek fotoduyarlı maddedir.
6. ALA-FDT çok çeşitli benign ve malign koşullarda yüksek etkinlik, minimal yan etki ve mükemmel kozmetik etki göstermiştir.
7. ALA diğer fotoduyarlı maddelere göre hızlı metabolizmaya ve malign lezyonlar için yüksek seçiciliğe sahiptir.
8. ALA kaynaklı PpIX'in 24 saat içerisinde sistemik olarak temizlenmesi, uzun süreli ışığa duyarlılığı ortadan kaldırır ve tedavinin kümülatif etkiler ve normal dokuya zarar verme riski olmadan düzenli aralıklarla tekrarlanmasına izin verir.

Bunlarla birlikte ALA-FDT'de tedavi ile ilişkili ağrı, sınırlı tümör penetrasyon derinliği gibi önemli dezavantajlar bulunmaktadır.

1. ALA hidrofilik bir yapıya sahip olduğundan cilt veya hücre zarlarına etkili bir şekilde nüfuz etmemektedir. Topikal ALA uygulamasından sonra PpIX'un üretimi, gerekli foto hassaslaştırmayı ortaya çıkarmak için yetersiz olabilen 2-3 mm'lik cilt yüzeyi ile sınırlı kalmaktadır ve bu anlamda penetrasyon yeteneğini sınırladığından, topikal verilmesini kolaylaştıran kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

En başarılı ALA türevleri esterlerdir, bunlar: metil ester (metil aminoluvulinat, MAL) ve heksil ester (heksil aminolevulinat, HAL). Bu ALA türevlerinin ALA üzerindeki avantajları temel olarak şunlardır:

1. Hedef bölgeye ulaşma hızları
2. Hücre içi boşluğa erişme hızları
3. Fotoaktif bileşiklere enzimatik dönüşüm oranları [92].

2.3.1.1. ALA'nın klinik uygulamaları

ALA aracılı FDT, cildin bazal hücreli ve yassı hücreli kanserlerine karşı oldukça başarılıdır. DUSA Pharmaceuticals tarafından tasarlanan ayaktan tedavi ile aktinik keratoz için ALA kullanan ve mavi ışık sistemi FDA onayına sahiptir. İnvaziv lezyonlar tam yanıt veremese de ALA baş ve boyun tümörleri için de başarılı olmuştur.

Norveçli bir şirket olan PhotoCure ASA, çok çeşitli lezyonlar için metillenmiş ALA (Metvix®) kullanmıştır. İlaç topikal olarak uygulanmaktadır ve yaklaşık 3 saat sonra kırmızı ışık aydınlatması ile beraber kullanılmaktadır. İlaçla kombine ışık tedavisi, birçok Avrupa ülkesinde aktinik keratoz ve bazal hücre lezyonlarının tedavisi için onaylanmıştır ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [118]. Bununla birlikte, tedavi sırasında ağrı yaygın bir morbidite olarak kalmaktadır.

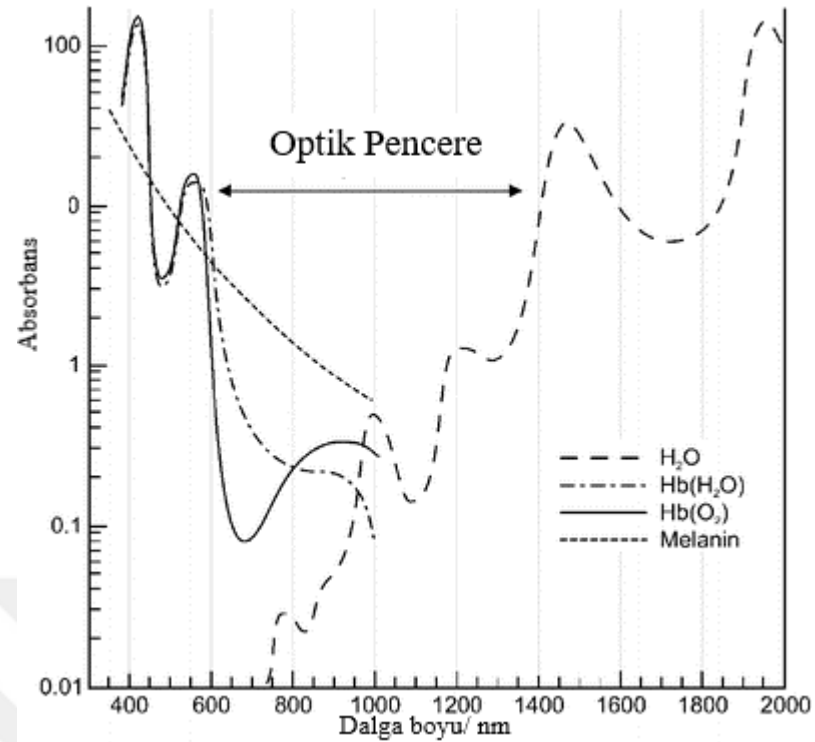
ALA'nın en büyük avantajı, fotodinamik terapi tedavisindeki etkilerinin 24 saat içinde kaybolması ve topikal uygulamalarında yan etki olasılığını azaltmasıdır [119]. ALA aracılı fotodinamik terapi teorik olarak akne tedavisi için güvenli bir seçenek olup tıp camiasında etkili ve güvenli bir tedavi seçeneği olarak geniş çapta kabul görmüştür, bu anlamda çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin Ding ve arkadaşları, ALA ve metil ALA aracılı FDT ile orta ve şiddetli yüz aknesi ile ilgili vaka çalışması yapmışlardır. Bu vaka çalışmasında, sistemik retinoid ve antibiyotiklere dirençli yüz akne lezyonlarını tedavi etmek için ALA aracılı fotodinamik terapi kullanımının fizibilitesi vurgulanmaktadır [120]. Yine benzer bir

çalışmada Tao ve arkadaşları, akne vulgaris tedavisi için topikal ALA aracılı fotodinamik terapi uygulaması yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda, orta ve şiddetli akne için ALA aracılı fotodinamik terapinin basit ve etkili bir tedavi olduğu vurgulanmıştır. Aynı hastalık için yapılan farklı bir çalışmada ALA aracılı fotodinamik terapi için yeni bir LED cihazı kullanılmıştır. Bu çalışmada, akne vulgaris tedavisinde LED tabanlı ALA aracılı fotodinamik terapinin etkinliği ve güvenilirliği test edilmiştir [120].

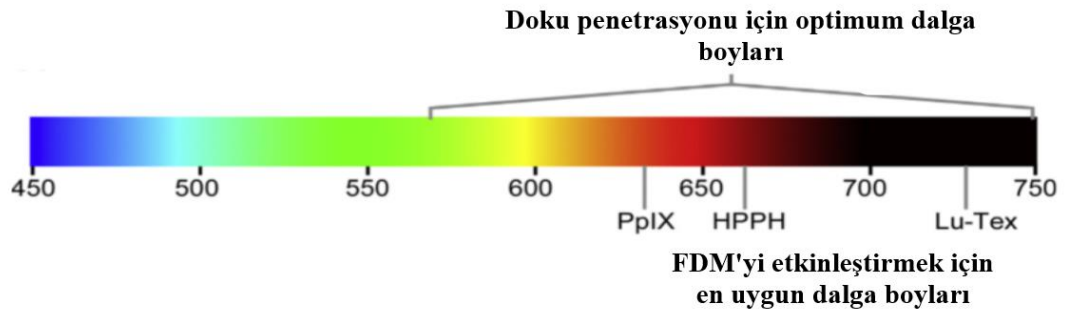
ALA özofagus tedavisi için başarılı olmuştur ve oral ilaç formu ile uygundur. Displastik epitel, ALA aracılı fotodinamik terapi ile güvenilir bir şekilde yok edilebilmektedir [119].

2.4. Fotodinamik Terapide Kullanılan Işık Kaynakları ve Dalga Boyu

Fotodinamik terapide bir fotobiyolojik reaksiyonun gerçekleştirilmesi için fotoduyarlı maddenin absorpsiyon spektrumuyla uyumlu ve ajanı aktivite edebilen yeterli güçte görülebilir ışık kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır [5]. İnsan organizması için en etkili dalga boyu 630 nm'nin üzerindeki dalga boylarıdır. Bu aralık, tedavinin başarısını sağlayan insan dokusuna uygun ve istenen seviyede nüfuz edebilmektedir [80]. Dokuda önemli kromoforlar su, oksihemoglobin, deoksihemoglobin, melanin ve sitokromlardır. Bu moleküllerin absorpsiyon spektrumları, dokuda FDT için optik pencereyi tanımlar [5]. 600 ile 1200 nm arasındaki bölgeye dokunun "optik penceresi" denir. Bununla birlikte, yaklaşık 800 nm'ye kadar olan ışık 1O_2 üretebilir, çünkü daha uzun dalga boyları fotodinamik bir reaksiyon başlatmak için yetersiz bir enerjiye sahiptir. Bu nedenle ışık kaynağı seçimi, fotoduyarlı madde absorpsiyonuna (floresan uyarma ve etki spektrumları), hastalığa (lokasyon, lezyonların boyutu, doku özellikleri gibi), maliyete ve boyuta dayanmaktadır [84].



Şekil 2.8. Fotodinamik terapi için optik pencere ve dokuda soğurulması [5]



Şekil 2.9. Görünür ve yakın kızıl ötesi ışık spektrumu, maksimum doku penetrasyonunun dalga boyları, bazı fotoduyarlı maddelerin absorbans dalga boyları [121]

FDT ışık kaynakları için temel şartlar, fotoduyarlı maddenin aktivasyon spektrumuna (genellikle en uzun dalga boyu zirvesi) uygun dalga boyundaki ışık ile bu dalga boyunda ergonomik olarak ve hedeflenen dokuya yüksek verimlilikte yeterli güç üretmektir. Tipik olarak uzun zaman gerektiren tedavileri uygulamak için 630-850 nm dalga boyu aralığında birkaç yüzmW/cm^2 ' ye kadar ışınlamalarda 1-5 W aralığında güç gereklidir ve bunlara ek olarak klinik ortamda güvenilir ve düşük maliyetli ışık kaynağı olmalıdır.

FDT ışık kaynaklarını üç ana sınıf altında toplayabiliriz: lazerler, LED'ler ve filtrelenmiş lambalar [122]. Geçmişte argon pompalı boya lazerleri, KTP veya Nd/YAG pompalı boya lazeri, altın buhar lazeri veya bakır buhar boya lazeri gibi çeşitli ışık kaynakları kullanılmıştır. Ancak bu tüm lazer sistemlerinin kullanımı karmaşık ve pahalıdır [123].

Lazer diğer ışık kaynaklarından farklıdır; çünkü lazer olmayan ışık kaynakları kendiliğinden yayılma nedeniyle her yöne tutarsız radyasyon gösterir. Lazer, kazanç ortamı açısından kategorize edilir: gaz, sıvı ve katı.

Gaz lazerleri olarak azot lazeri, asil gaz lazeri (helyum-neon (He-Ne), argon (Ar), kripton (Kr)), excimer lazer, soygaz ve halojen, helyum-kadmiyum (He-Cd), bakır buhar lazeri ve karbondioksit (CO_2) lazeri ışık kaynaklarıdır. He-Ne lazer yaygın olarak düşük maliyetli ve sabit bir sürekli dalga lazeri olarak kullanılmaktadır. Ar ve Kr lazer, stabil ve yüksek güçlü görünür ışık dalga lazeri olarak kullanılmaktadır. CO_2 lazer en yüksek güç (birkaç mW-100 kW) sürekli dalga lazeridir ve kızılötesi ışın üretmektedir.

Boya lazeri, çözeltide lazer ortamı olarak organik boya kullanır. Boya lazeri, gaz ve katı kazanç ortamına kıyasla çok çeşitli dalga boyları göstermektedir.

Katı hal lazerleri olarak Nd:YAG , Nd: YLF, Nd: YV04, Er:YAG, Ti: Safir ve yarı iletken lazerler bilinmektedir [71].

1970'lerin sonu 1980'lerin başında, çoğu klinik tedavi için argon boya lazeri kullanılmıştır. Yeterli güç üretmesi ve dalga boyu ayarlanabilme avantajına sahip olmasına rağmen boyut, elektrik gücü, su soğutma gereksinimleri ve zayıf güvenilirlik nedeniyle klinik ortam için uygun değildir. 1980'lerde bu ışık kaynağı Nd: YAG (KTP) lazer kaynağı ile değiştirilerek bazı güvenilirlik ve soğutma sorunlarını çözmüş ancak yine de hantal ve pahalı olmuştur. Günümüzde KTP-boya sistemlerinin yerini diyot lazerler almıştır [122].

Yarı iletken lazerler, genellikle diyotlar olarak adlandırılan, FDT’de kullanılan standart lazer sistemlerinin optik konfigürasyonlarını gerektirmeyen en temel ışık kaynaklarından biridir. 2000 yılında FDA tarafından bazı hastalıkların tedavisinde 630 nm diyot lazerinin onayı alınmıştır. 652 nm’ de diyot lazer sistemi Avrupa, İzlanda ve Norveç’te onay verilmiştir [123]. Bu lazerler uygun maliyetlidir, küçük boyutludur, kurulumu kolaydır, optik dozimetri ve kalibrasyon özelliklerine sahiptir, daha uzun ömürlüdürler ve kırmızıdan maviye geniş bir dalga boyu aralığını kapsamaktadırlar. Diyot lazerlerin ana sınırlandırılması, tek dalga boyulu cihazlar olmalarıdır bu yüzden her fotoduyarlı madde için ayrı bir ünite gerekir [124, 125].

Işık yayan diyotlar (LED), özellikle kolay erişebilir doku yüzeylerinin ışınlanması için son birkaç yılda FDT için uygun bir teknoloji haline gelmiştir. LED’ler kompakt, hafiftir ve istenilen dalga boyunda ışık üretmek için daha az enerji gerektirir. Diyot lazer kaynaklarına göre en büyük avantajı, düşük maliyetlidir ve LED dizilerini farklı ışılama geometrilerine göre yapılandırma kolaylığıdır. İlk başlarda çıkış gücü bir sınırlama olarak kullanılıyordu ancak şu anda görünür-NIR spektrumun çoğunda yüzlerce mW/cm^2 olan LED dizileri mevcuttur. Lazer diyotlarda olduğu gibi LED’lerin sabit çıkış dalga boyları vardır [122, 124].

FDT sırasında radyasyon ışınmı ve stabilitesi sürekli kontrol edilmelidir. Işık kaynağına maruz kalma süresi çok düşük radyasyon süreleri ile çok uzun olabilir ancak FDT’de çok yüksek radyasyonlarda ek bir termal etki olabilir. FDT’de ışığın doku içinde ulaşabileceği derinlik kullanılan ışığın dalga boyuna bağlıdır ve ışığın dalga boyu arttıkça dokulara nüfuz etme artar.

Çeşitli FDT uygulamalarının ışık dozları, fotoduyarlı maddelerin tipi, ışık verme modu, tümörün yeri ve boyutu, kanserlerin türü vb. gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Tümörün büyüklüğü ve yeri, FDT ışık iletimi modunu belirlemek için en önemli kriterdir [124]. Fotoduyarlı maddelerin aktivasyonunu sağlamak amacıyla ışık vermek için lazer kullanmanın belirgin avantajlarından biri, bu ışığı fiber optiklere kolayca bağlanabilmesidir. Bu aktive edici fotonların doğrudan hedef bölgeye ulaştırılmasını sağlayarak terapötik özellikleri ve terapinin özgülüğünü optimize

edilmektedir. FDT'nin etkili olması ve istenen terapötik etkiyi indüklemek için ışık dağıtımının hedef doku hacmi boyunca homojen ve yeterli olması gerekmektedir [124].

2.5. Oksijen

Bir tümörde oksijen varlığı, fotodinamik tedavinin sonucu için önemlidir çünkü fotokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için O_2 gereklidir ve hipoksik bölgeler nispeten tepkisiz olma eğilimi göstermektedirler. Oksijen basıncı (pO_2), tümör bölgeleri arasında büyük ölçüde değişebilmektedir ve aynı zamanda tümör damar yapısına, oksijen difüzyon oranlarına bağlıdır. Oksijenin kullanılabilirliği temel olarak derin solid tümörlerde bir sorun oluştururken yüzeysel cilt tümörlerinde O_2 seviyeleri hız sınırlayıcı olmamaktadır.

Fotodinamik tedavinin ışık ile uyarılma işlemi sırasındaki O_2 tüketiminin oranı başka bir önemli unsur olmaktadır. Yüksek yoğunluklu bir ışık kaynağı altında O_2 , dokudaki hızından daha hızlı tüketilebilmektedir ve bu durum tümörlü dokuda geçici O_2 tükenmesine neden olmaktadır.

Bu manada etkili bir fotodinamik terapi süreci tasarlarken tümör mikro çevresindeki O_2 seviyelerinin dikkatli bir şekilde idaresi, tedavi sırasında O_2 tükenmesini en aza indirmek için fraksiyonlu ışık kullanmak veya tümör dokusunu fotoduyarlı madde ile hedefleyip uygun dalga boyundaki ışık ile uyarmak çok önemlidir [94].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yürütülen bu çalışmada, WI-38 (ATCC® CCL-75™) normal akciğer fibroblast ve HT29 (HT-29 (ATCC ® HTB-38™) kolon epityal tümör hücre hattı kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan araç-gereçler

3.2.1.1. Sarf malzemeler

Tablo 3.1. Sarf malzemeler

Malzemeler	Markası
Mikro pipetler ve pipet uçları(10 µ'lik, 100 µ'lik, 1000 µ'lik)	Isolab
Kültür flaskları (25 cm ² T25 ve 75 cm ² T75)	Isolab
Steril santrifüj tüpleri (15 ml'lik ve 50 ml'lik)	vwr
Serolojik pipet (5 ml'lik)	CAPP Harmony
Pleyt (96'lık)	Atlas biyoteknoloji, IS/TCF-96 WELL
Enjektör	Ayset, Türkiye
Filtre	Sartorius, 16534K
Pipetör	HTL Lab solutions
Thoma lamı	Isolab

3.2.1.2. Cihazlar

Tablo 3.2. Cihazlar

Cihaz	Markası
İnvert mikroskop	Motic
Mikroplate okuyucu spektrofotometre	BMG Labtech
CO ₂ 'li inkibatör	Nüve
Laminar kabin	Miprolab
Buzdolabı (+4 - +20)	Altus
Derin dondurucu (-80)	Arctiko
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5702R
Otoklav	
Hassas terazi	
Kolimatör	Thorlabs, F810SMA-635
Optik güç ölçer ve spektrofotometre	PM100 ve C serisi spektrometre, Thorlabs, Almanya
Fotodinamik terapi lazer cihazı	Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sakarya
Fotodinamik terapi LED cihazı	Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sakarya

3.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Tablo 3.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Kimyasal	Markası
DMEM-High Glucose (4.5 g/l) with L-Glutamine	Capricorn, DMEM-HA
Dulbeccos's Phosphate-buffered saline(1X) w/o Ca&Mg w/o	Capricorn, PBS-1A
Phenol Red	
Penicilin/ Streptomycin Solution (100x)	Capricorn, PS-B
Fetal Bovine Serum	Sigma, F7524
Trypsin- EDTA Solution	Sigma, T4049
Trypan Blue Stain	A.B.T.,15250061
5-Aminolevulinic acid hydrochloride	Sigma, A3785-500MG
Dimethyl Sulfoxide	Isolab, 914.036.2500-2.5L
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Biotium, 10059
XTT	

3.2.2.1. Hücre besiyeri

45.5 ml DMEM-HA L-Glutaminli besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenecek şekilde hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.2.2. ALA-5

Tablo 3.4. Kullanılan fotoduyarlı madde

Kullanılan fotoduyarlı madde	Fotoduyarlı maddenin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu
5-ALA	167,59 g/mol-0,597 M

0.1 g 5-ALA, 1 ml steril su içerisinde çözdürüldü ve -20°C'de muhafaza edildi. 0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM konsantrasyonlarında hazırlandı.

3.2.2.3. 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

Toz haldeki formu ile ticari olarak temin edilen MTT'den 0.1 g tartılıp 20 ml PBS içinde çözüldü. Daha sonra 1 ml kriyotüplere bölünerek -20°C'de muhafaza edildi.

3.3. Analizler

3.3.1. Hücrelerin kültüre alınması

Hücreleri çözmek ve canlılık kontrollerinin sağlanması amacıyla -80°C dondurucudan alınan ve kriyotüpler içinde bulunan hücreler 37°C'lik su banyosunda hızlıca çalkalanarak, yaklaşık 1 dakika içinde çözülmeye kadar bekletildi. Buzları çözülen kriyotüplerin etrafı %70'lik alkol ile temizlendikten sonra laminar akımlı kabine alındı. Kriyotüp içinde bulunan 1 ml hacmindeki hücreler falkonlara alınarak üzerlerine 6 ml taze besiyeri eklendi. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml taze besiyer eklendi ve

homejenize edildi. Daha sonra flasklara hücre ekimleri yapıldı ve CO_2 inkibatöre büyümeleri için bırakıldı.

Hücreler konfluent duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu yüzden hücreler istenilen morfolojik özellikte büyüüp çoğaldıklarında ve flask zemininde daha fazla hücre gelişimi için alan kalmadığında çalışılacak hücreler için pasajlama işlemine geçildi; daha sonra çalışılacak hücreler için de dondurma işlemi gerçekleştirildi. Flask dik konuma getirilerek hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değiştirilmeden ortam yavaşça çekildi. Hücre tabakasına pipet değiştirilmeden 3 ml PBS ile yüzey yıkandı ve ardından PBS çekildi. Daha sonra ortama %25 tripsin-ETDA eklenerek (T25 flask ve T75 flask için yüzeyini kaplayacak kadar yeterlidir $\approx 1-2$ ml) flask 5 dakika CO_2 inkibatöründe tutuldu. Hücrelerin serbestleşip serbestleşmediği mikroskopta kontrol edildikten sonra (hücreler serbestleştiyse), tripsin aktivitesini durdurmak için %10'luk FBS içeren besi yeri ortama eklenerek santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklendi ve homojenize edildi. Hücre yoğunluğuna göre ekimi yapılacak hücreler yeni flasklara alınarak CO_2 inkibatörüne yerleştirildi. Dondurma işlemi için santrifüj işleminden sonra 1:9 oranında DMSO ve hücre süspansiyonu kryotüp içerisine alındı. Kryotüpler ilk olarak $-20^{\circ}C$ de 1 saat bekletildikten sonra $-80^{\circ}C$ de muhafaza edildi.

3.3.2. Tripan mavisini ile hücre sayımı

Hücrelerin 96'lık well platalere ekimi için hücreler, tripan mavisini ve thoma lamı kullanılarak sayımları yapıldı. Hücre süspansiyonu ve tripan mavisinden 1:1 oranında alınarak ependorf tüpüne aktarıldı. Daha sonra ependorf içersinde pipetaj yapılarak thoma lamının sayım bölgesine aktarıldı ve invert mikroskop altında incelendi. Tripan mavisini sadece ölü hücre içine girerek onları boyarken canlı hücreler içine giremez ve canlı hücreler parlak görünür. Bu şekilde mikroskop altında görüntü değerlendirildi ve aşağıdaki eşitlik (Denklem 3.1) kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

Total canlı hücre sayısı =

$$16 \text{ büyük karede sayılan canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$

3.3.3. Işık kaynakları

Lazer cihazı dört farklı radyasyon modu ile çalışmaktadır: Sürekli Dalga Modu (CW), Darbe Modu (PM), Seri Darbe Modu (BPM) ve Süper Darbe Modu (SPM). Lazer ışık kaynağı DC ila 20 MHz arasındaki çeşitli darbe frekansları ile çalışabilmektedir. Lazer sistemi hassas akım ve sıcaklık kontrolü ile yüksek optik çıkış kararlılığına sahiptir. Bu sistem 0-1500 mW aralığında, yüksek optik çıkış kararlılığına (± 1 mW) 635 nm de yüksek dalga boyu kararlılığına (± 1 nm) ve tüm radyasyon modlarında yüksek sıcaklık (± 0.2 °C) kararlılığına sahiptir. Darbe süresi ve optik güç kullanıcı arayüzünden ayarlanabilmektedir. Akım, sıcaklık, voltaj ve fotodiyot optik geri beslemesine göre kontrolör tarafından sürekli olarak ayarlanır [126].



Şekil 3.1. Lazer cihaz düzeni

LED sistemi, 635 nm'de 0 ile 100 mW arasında optik güç üretmek için yüksek optik çıkış kararlılığı ile geliştirilmiştir. LED bağlantı sıcaklığı termoelektrik soğutma (TEC) sistemi ile stabilize edilmiştir. LED sistemiyle aynı optik çıkış gücünü üretebilmek için, LED bağlantı sıcaklığı üreticinin veri sayfasında belirtildiği gibi 44°C'de sabitlenmiştir. Sıcaklık kontrol sisteminin temel prensibi, LED'in Peltier elemanları soğuk tarafı ile doğrudan temas halinde olması ve soğutucu, fan ile doğrudan temas halinde olmasıdır. Termistör, LED bağlantısından sıcaklığın gerçek

zamanlı olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Gerçek zamanlı sıcaklık kontrol sistemi daha önceki çalışmalarla aynı prensipte uygulanmıştır [127]. Sistem, daha uzun deney süresi nedeniyle dalga boyu kaymasını önlemektedir.

Optik çıkış sürekli olarak fotodiyot ile ölçülmüştür. Gerçek zamanlı optik güç çıkışı kalibrasyonu, fotodiyot transimpedans amplifikatör devre çıkışına göre yapılmıştır. LED sistemi, kullanıcıya herhangi bir hata olmadan istenen optik gücü üretme yeteneği veren dokunmatik ekran ve yerleşik sistem tabanlı denetleyiciden oluşmaktadır. Optik güç ve zaman deneye göre seçilmiştir ve sistem enerjiyi hesaplayabilmiştir. Deneylerde, LED ışık kaynağının dalga boyu 635 ± 10 nm FWHM'de (tam genişlikte yarı maksimum) gerçekleştirilmiştir. Deneylerde sürekli dalga radyasyon modu kullanılmıştır.



Şekil 3.2. LED cihazı düzeni

Bu çalışmada 10 J/cm^2 , 15 J/cm^2 ve 20 J/cm^2 sürekli dalga modu ve puls dalga modu kullanılmıştır.

Sistemin optik gücü ve dalga boyu, güç ölçer ve spektrometre (PM100 ve C serisi spektrometre, Thorlabs, Almanya) ile ölçülmüştür. Fluence oranı, Tablo 3.5.'te özetlendiği gibi farklı güç ve deney süreleri ile belirlenmiştir.

3.3.4. Optimizasyon çalışmaları

Fotodinamik terapi çalışması öncesi hücreler için gerekli ilaç dozu ve ışık dozu araştırılması yapılmıştır. Uygun ışık ve ilaç dozları 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) sitotoksosite deneyi ile belirlendi. Bu optimizasyon çalışmaları HT-29 ve WI-38 hücre hatları için, 3 tekrarlı olmak üzere yapılmıştır.

3.3.4.1. İlaç dozu uygulaması

HT-29 ve WI-38 hücreleri ilaç dozlarına bağlı olarak 96'lık well pleytlere 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekimi yapılarak 20-24 saat inkübe edildi. Her bir fotoduyarlı madde ve inkübasyon süreleri için kontrol grupları oluşturuldu. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besi yeri atılarak FBS'siz besi yeri ve ilaç karışımı totalde 100 µl olacak şekilde hücrelerle muamele edildi.

5-ALA için hücreler Tablo 3.4.'de belirtilen dozlarda, 4 saat süre ile karanlıkta 37°C 'de %5'lik CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon işlemlerinden sonra 5-ALA ile muamele edilen hücrelerdeki ortam uzaklaştırılarak %10 FBS içeren besi yeri eklendi ve 1 gece inkübasyonun ardından MTT analizi yapıldı.

3.3.4.2. Işık dozu uygulaması

Lazer ve LED cihazlarının ışık dozları aşağıdaki eşitlik (Denklem 3.2) kullanılarak hesaplandı.

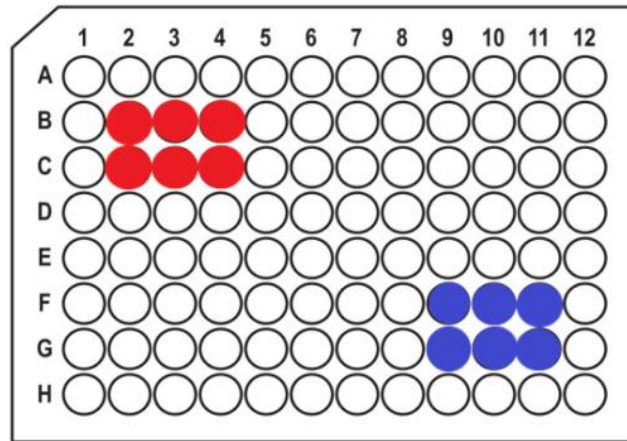
$$J = W \times s \quad (3.2)$$

J= joule, W= mW cinsinden güç ve s=saniye türünden zamanı ifade etmektedir.

96'lı well pleytlerin dört bir köşesine düşen ışığın çıkış gücü güç ölçer ile ölçüldü. Ht-29 ve WI-38 hücreleri ışık dozlarına bağlı olarak 96'lık well pleytlerin köşelerine alt alta 2'li toplamda 4 kuyucuğa 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekimi yapılarak 20-24 saat inkübe edildi. Lazer ve LED cihazları için ayrı pleytler hazırlandı ve Tablo 3.4.'te belirtilen fluence oranlarında ışık uygulaması yapıldı. Bir well pleytte iki ışık dozu gerçekleştirecek şekilde, lazer ve LED için toplam 6 tane well pleyt hazırlandı (Şekil 3.3.). Kontrol hücreleri ise hiçbir muamele görmeden 37°C 'de %5'lik CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. Işık uygulamalarının ardından hücreler karanlıkta 37°C 'de %5'lik CO_2 içeren inkübatörde 1 gece inkübe edildi ve ardından XTT analizi yapıldı.

Tablo 3.5. Işık dozları

Enerji:(J)	Güç(mW)	Zaman (dk/s)
5	30	167 s
10	30	334 s
15	30	500 s
20	30	667s
25	30	834s
30	30	1000s



Şekil 3.3. Deney düzeneği (B1-C1,B2-C2,B3-C3,B4-C4 hücreleri 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 'yi; F9-G9,F10-G10,F11-G11 hücreleri 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 yi göstermektedir.)

3.3.5. Ana deney çalışması

3.3.5.1. Fotodinamik terapi

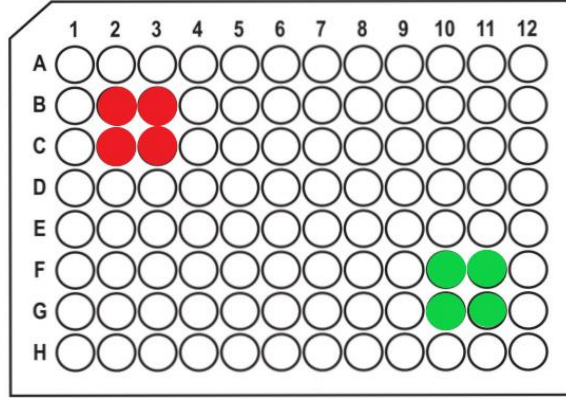
Işık dozu ve ilaç dozu uygulamaları sonucu seçilen dozlarla ana çalışmaya geçilmiştir. Seçilen ışık dozları, ALA-5 ile HT-29 hücre hattı için fotodinamik terapi yapılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Fotodinamik terapide kullanılan ALA-5 konsantrasyonu 1 mM ve inkübasyon süresi 4 saattir. Lazer ve LED'in ışınlanma miktarı ise 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 'dir. Analizler, deney uygulamalarından 24 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.6.'da belirtilen dozlarla ve Şekil 3.4.'te gösterilen deney düzenekleri LED ve Lazer ışık kaynakları için ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Tedavi sonrası hücrelerde XTT yöntemi ile canlılık tayini yapılmıştır.

Tablo 3.6. Lazer ve LED için dozlar

ENERJİ (J/cm^2)	GÜÇ (mW)	ZAMAN (s)	DALGA MODU
10	40	500	Puls
10	40	250	Continious
10	80	250	Puls
10	80	125	Continious
15	40	750	Puls
15	40	375	Continious
15	80	375	Puls
15	80	187.5	Continious
20	40	1000	Puls
20	40	500	Continious
20	80	500	Puls
20	80	250	Continious



Şekil 3.4. Deney düzeneği (10 j/cm² ve 40 mW, 10 j/cm² ve 80 mW, 15 j/cm² ve 40 mW, 15 j/cm² ve 80 mW, 20 j/cm² ve 40 mW, 20 j/cm² ve 80 mW güç değerleri için ,B1-C1,B2-C2 hücreleri ve F9-G9,F10-G10, sırasıyla puls ve continuous dalga modunda deney düzeneğini göstermektedir. Her bir doz için bu düzende farklı pleytler hazırlanmıştır.)

3.3.6. Hücre sitotoksosite deneyleri

3.3.6.1. MTT yöntemi

MTT analizi, hücre hattının hücre canlılığını kontrol etmek, ilacın güvenli ve etkili miktarını değerlendirmek için en etkili yöntemlerden biridir. MTT analizi, sitotoksosite veya sitostatik aktiviteyi değerlendirmek için kolorimetrik bir analizdir. Tanımlanmış koşullar altında, NADPH'ye bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri, canlı hücrelerin sayısını yansıtmaktadır. MTT hücrelere girer ve mitokondriye geçer, bu enzim çözünmeyen bir formazan ürünüde tetrazolium tuz MTT'sini indirger (mor renkte tetrazolium tuzunun dehidrojenaz ve redüktaz ile indirgenmesiyle oluşturulan yapay bir kromojenik üründür). DMSO, asitleştirilmiş izopropanol gibi orjenik çözücüler, hücrelerdeki çözünmez formazanın çözülmesini sağlayan çözücülerdir. Hücrelerdeki formazan kristalleri bu çözücülerle çözündürülür ve çözünmenin ardından formazan kristallerinin konsantrasyonu, spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmektedir [128].

İlaç dozu uygulamalarının 1 gecelik inkübasyonunu ardından deney grupları ve kontrol grupları hücrelerinin pleytlerinin her bir kuyucuğuna 10 µl MTT eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. 3 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından elisa

okuyucu spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Aşağıdaki eşitlik (Denklem 3.3) kullanılarak elde edilen veriler ile canlılık hesaplanmıştır.

3.3.6.2. XTT yöntemi

XTT hücresi çoğalma deneyi ilk olarak 1988 yılında Scudiero ve arkadaşları tarafından tümör hücre hatlarında hücre büyümesini ve ilaç duyarlılığını ölçmek için etkili bir yöntem olarak tarif edilmiştir. XTT, indirgenğinde parlak turuncu hale gelen renksiz veya hafif sarı bir bileşiktir. Bu renk değişimi, pozitif yüklü kuaterner tetrazol halkasının parçalanmasıyla gerçekleşmektedir. XTT redüksiyonunun formazan ürünü çözüdür ve gerçek zamanlı analizlerde kullanılabilir. XTT'nin net negatif yükü ile hücrelere girmesini engellemektedir. XTT boya indirgenmesinin, trans-plazma membran elektron taşınması ile kolaylaştırılan hücre yüzeyinde meydana geldiğini göstermektedir. Mitokondriyal oksidoredüktazların, indirgeyicilerinin plazma zarına aktarılmasıyla XTT yanıtına önemli ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. XTT tahlillerinin aslında hücrelerin piridin nükleotid redoks durumunu ölçtüğü öne sürülmüştür. XTT tek başına bir tespit reaksiyonu olarak kullanılabilir ancak sonuçlar optimal değildir. XTT ile PMS (N-metil dibenzopirazin metil sülfat) gibi bir ara elektron alıcısı kullanıldığında XTT tahlil sonuçları büyük ölçüde iyileşmektedir. PMS, XTT test kitinde bulunan Aktivasyon Reaktifidir. Bulgular, PMS'nin hücre yüzeyinde veya plazma membranında kolayca erişilebilir bir bölgede elektronları alarak XTT indirgenmesine aracılık ettiğini ve daha sonra yüksek pigmentli formazan ürününe XTT'yi azaltan reaktif bir ara madde oluşturduğunu göstermektedir [129].

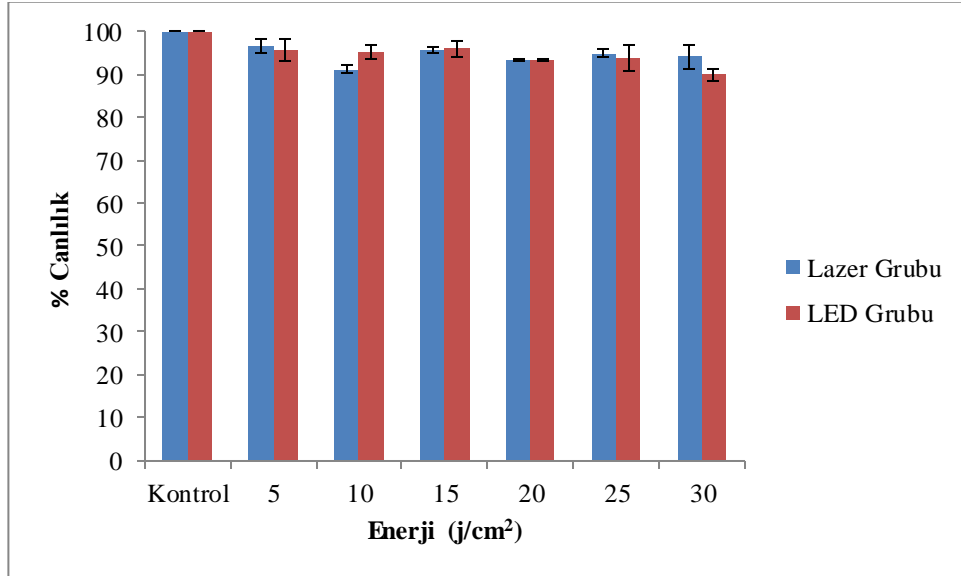
Işık ve tedavi uygulamalarının 1 gecelik inkübasyonunu ardından deney grupları ve kontrol grupları hücrelerinin pleytlerinin her bir kuyucuğuna 50 µl XTT eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. 3 saatlik inkübasyonun ardından elisa okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Aşağıdaki eşitlik (Denklem 3.3) kullanılarak elde edilen veriler ile canlılık hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(OD_{DENEY} - OD_{blank})}{(OD_{KONTROL} - OD_{blank})} \times 100 \quad (3.3)$$

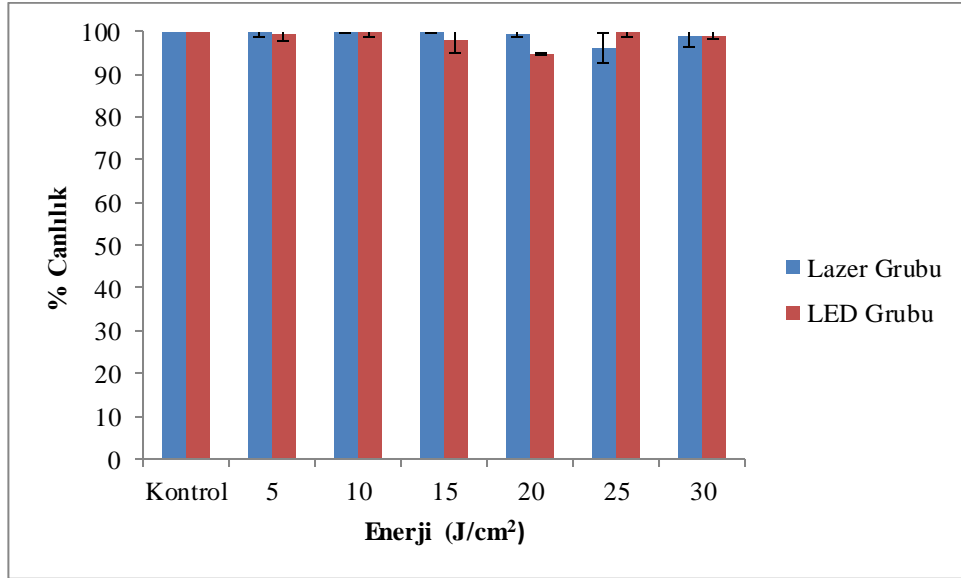
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Canlılığı Üzerine Işık Bağımlılığı

Ana çalışma için gerekli ışık dozlarını belirlemek ve in vitro fotodinamik terapi etkinliğini kanıtlamak adına HT-29 kolon kanseri hücre hattında ve WI-38 akciğer fibroblastı hücre hattında ışık dozu çalışması gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattında ayrı ayrı lazer ve LED ışık kaynakları ile 5 j/cm^2 , 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 , 25 j/cm^2 ve 30 j/cm^2 olmak üzere 6 farklı ışık dozları ile optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ışık ile muamelesinden 24 saat sonra XTT testi ile sitotoksitesine bakılarak ana çalışma için etkin ışık dozları belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Ana deney çalışmaları için 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 ışık yoğunlukları seçilmiştir.



Şekil 4.1. Lazer ve LED için farklı ışık dozlarında HT-29 kolon kanserinin hücre canlılık yüzdeleri

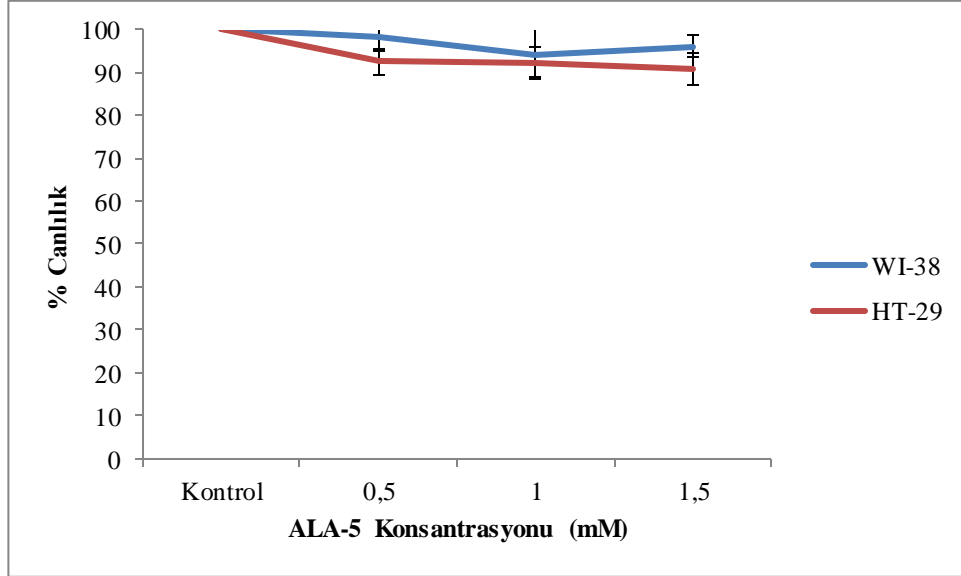


Şekil 4.2. Lazer ve LED için farklı ışık dozlarında WI-38 akciğer fibroblastı hücre canlılık yüzdeleri

4.2. Hücre Canlılığı Üzerine İlaç Dozu Bağımlılığı

Fotodinamik terapi uygulamaları için öncelikle fotoduyarlı madde dozu belirlemek için optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattı ve WI-38 akciğer fibroblast hücre hattı üzerinde 3 farklı ALA-5 dozu çalışılmıştır.

Hücreler 4 saatlik ALA-5 uygulaması ardından 24 saatlik süre sonunda MTT analizi ile sitotoksitesi değerlendirilmiştir. MTT sonuçları değerlendirilerek ana çalışma için 1 mM'lık ALA-5 dozu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı ALA-5 konsantrasyonlarının MTT hücre canlılık yüzdeleri

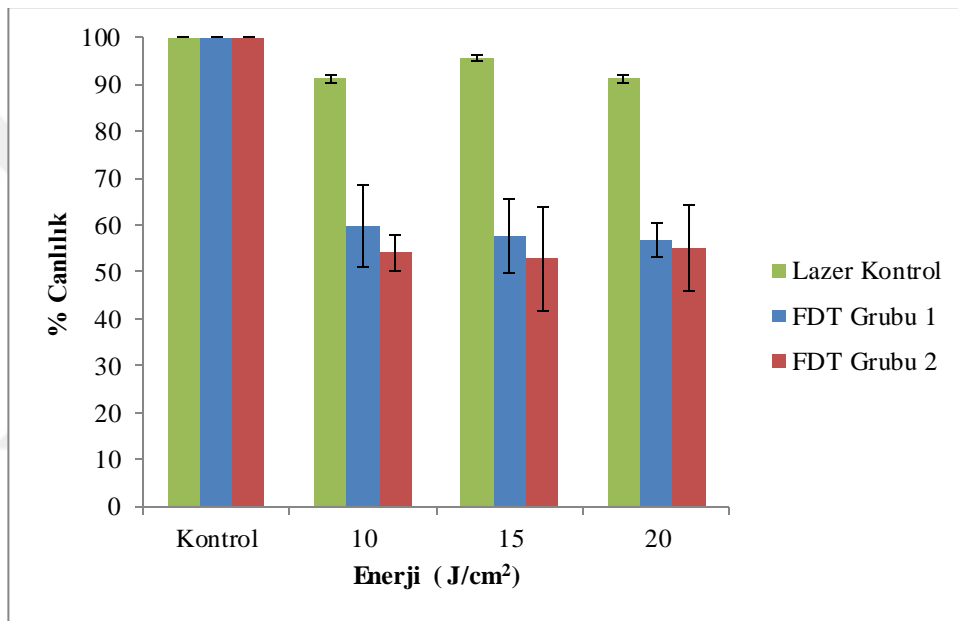
4.3. Ana Deney Çalışması Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen ışık ve ALA-5 dozları ile ana deney çalışması gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattında 4 farklı deney grupları oluşturulmuştur. 1.grup lazer aracılı devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT, 2.grup lazer aracılı puls dalga modu ile gerçekleştirilen FDT, 3.grup LED aracılı devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT ve 4.grup LED aracılı puls dalga modu ile gerçekleştirilen FDT'dir.

Sonuçlar Microsoft Excel 2010 programında veri çözümüyle aracı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

İlk deney grubu kendi içinde iki uygulama grubu oluşturulmuştur. 40 mW/cm^2 ve 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılarak in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattında 1 mM ALA-5 dozu ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası devamlı dalga modunda 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarında ışınlanmıştır. Fotodinamik terapi sonrası hücrelerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda XTT testi yapılarak hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

1.uygulama grubunda 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 1.uygulama grubu 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %59,81, %57,66 , %56,71 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 2.uygulama grubunda 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 2.uygulama grubu 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %54,06, %52,84, %55,12 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.4.).

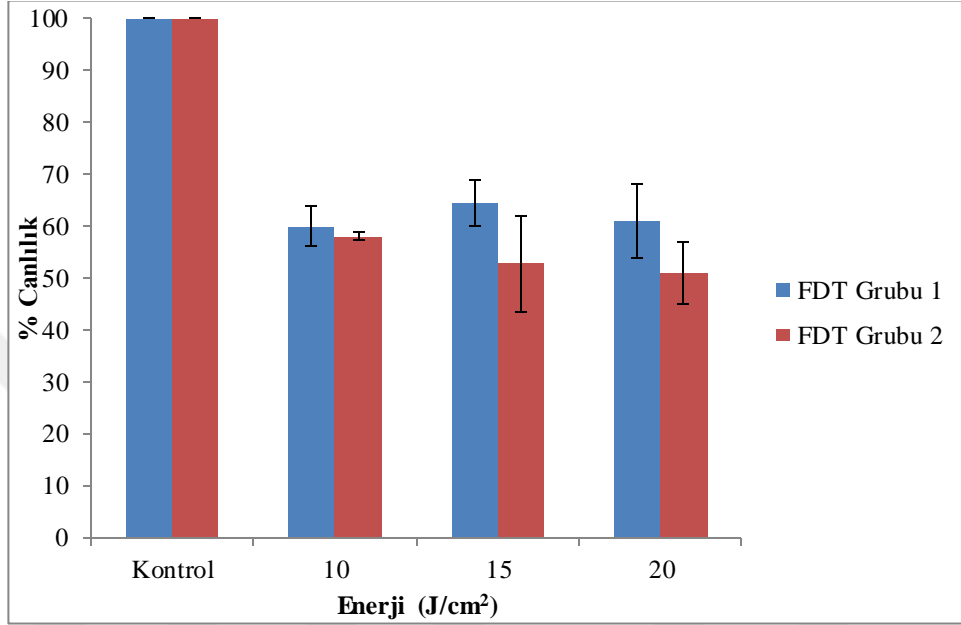


Şekil 4.4. Birinci FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait XTT hücre canlılık yüzdeleri

İkinci deney grubu kendi içinde iki uygulama grubu oluşturulmuştur. 40 mW/cm^2 ve 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılarak in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattında 1 mM ALA-5 dozu ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası puls dalga modunda 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarında ışılanmıştır. Fotodinamik terapi sonrası hücrelerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda XTT testi yapılarak hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

1.uygulama grubunda 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %59,94, %64,29, %61,02 olarak belirlenmiştir

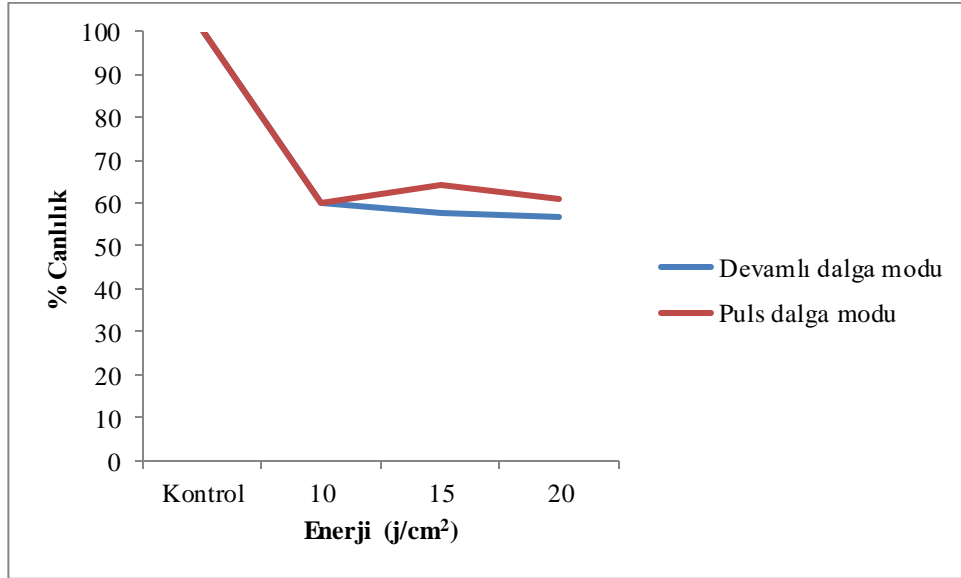
($p < 0,05$). 2.uygulama grubunda 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %58,04, %52,81, %50,96 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. İkinci FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri

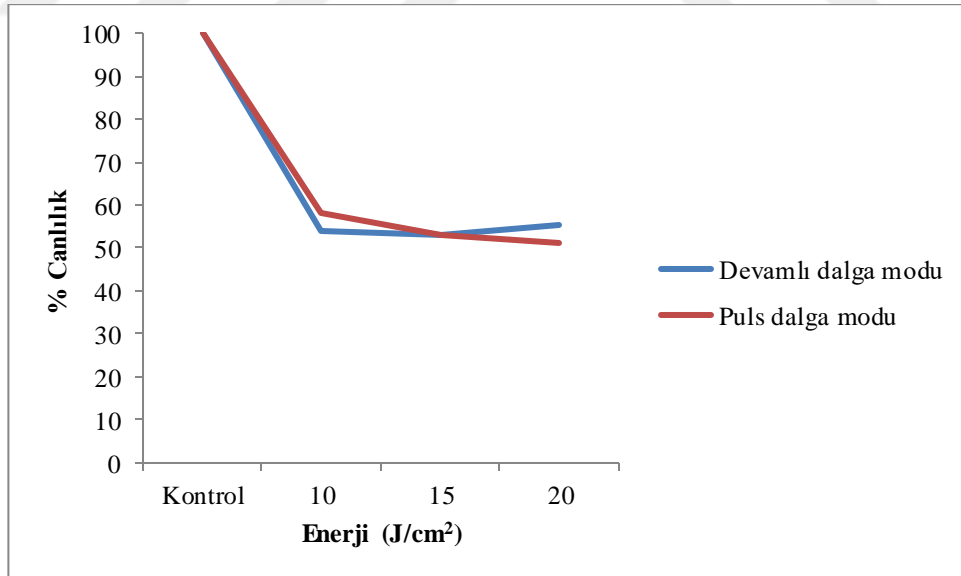
Lazer ışık kaynağı ile HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde devamlı dalga modu ve puls dalga modu kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* FDT'nin karşılaştırılmalı sonuçları grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Analiz sonucuna göre 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT'nin daha sitotoksik özellikler gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları

80 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT'nin 10 J/cm^2 ve 15 J/cm^2 enerji yoğunluklarında daha sitotoksik özellikler gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.7.).

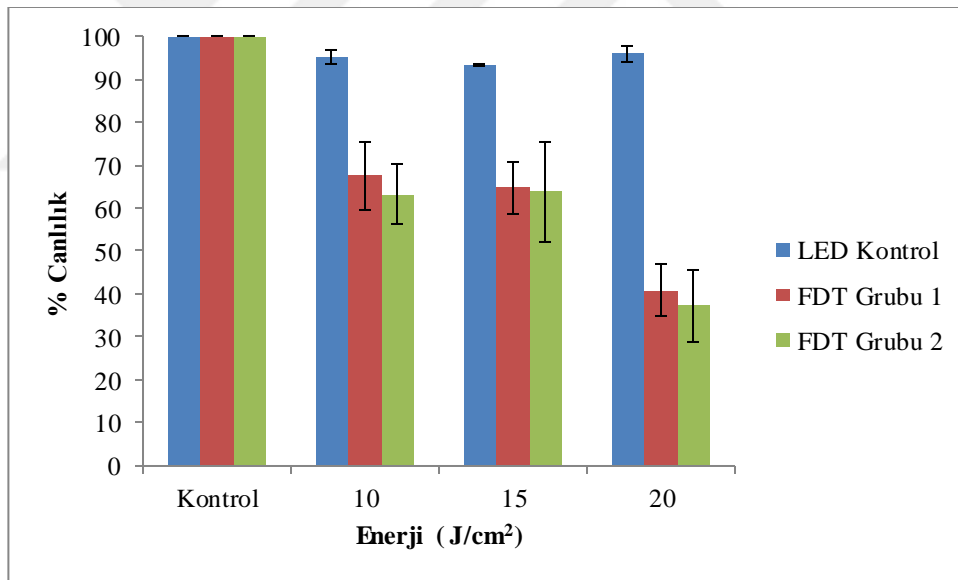


Şekil 4.7. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları

Üçüncü deney LED grubu kendi içinde iki uygulama grubu oluşturulmuştur. 40 mW/cm^2 ve 80 mW/cm^2 güç yoğunlukları kullanılarak in vitro çalışmalar

gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattında 1 mM ALA-5 dozu ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası devamlı modunda 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarında ışınlanmıştır. Fotodinamik terapi sonrası hücrelerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda XTT testi yapılarak hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

1.uygulama grubunda 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %67,50, %64,59, %40,74 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 2.uygulama grubunda 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %63,22, %69,74, %37,30 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.8.).

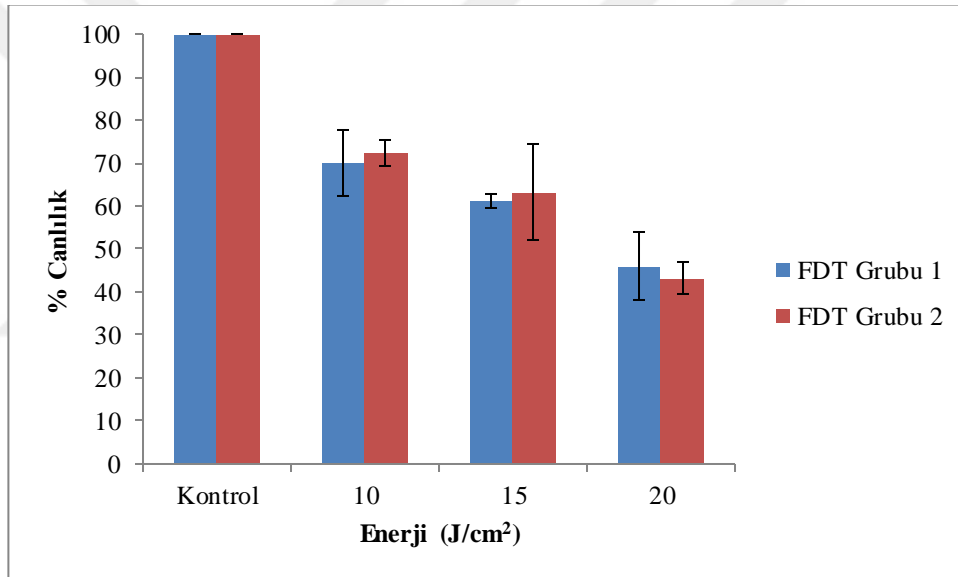


Şekil 4.8. Üçüncü FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri

Dördüncü deney LED grubu kendi içinde iki uygulama grubu oluşturulmuştur. 40 mW/cm^2 ve 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılarak in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HT-29 kolon kanseri hücre hattında 1 mM ALA-5 dozu ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası puls dalga modunda 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarında ışınlanmıştır. Fotodinamik terapi sonrası hücrelerin

24 saatlik inkübasyonu sonunda XTT testi yapılarak hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

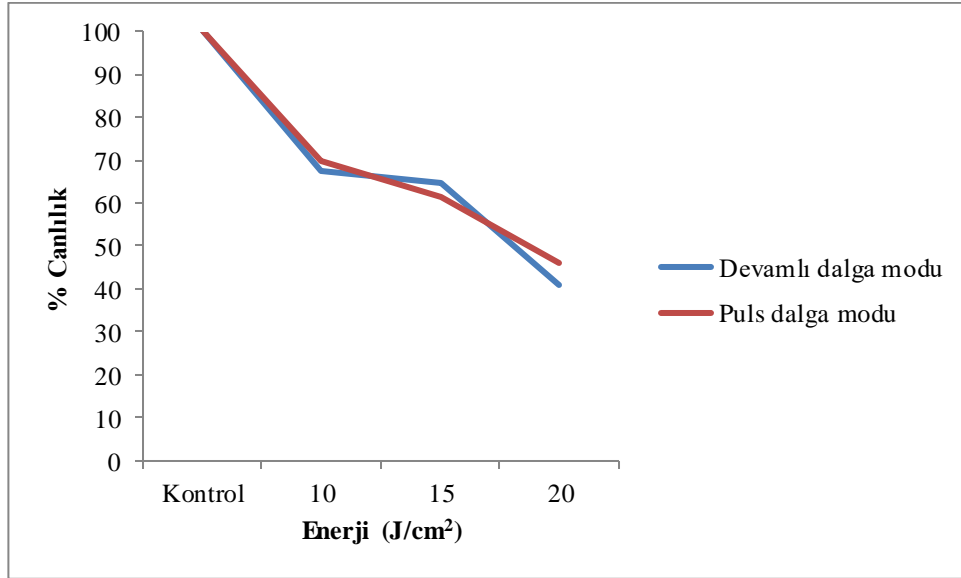
1.uygulama grubunda 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %69,97, %61,25, %45,89 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 2.uygulama grubunda 80 mW/cm^2 güç yoğunluğu kullanılmıştır. 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 enerji yoğunluklarıyla gerçekleştirilen FDT'nin XTT analizi sonucu canlılık yüzdeleri sırası ile %72,37, %63,22, %43,18 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Dördüncü FDT grubunun uygulama grubu 1 ve uygulama grubu 2'ye ait hücre canlılık yüzdeleri

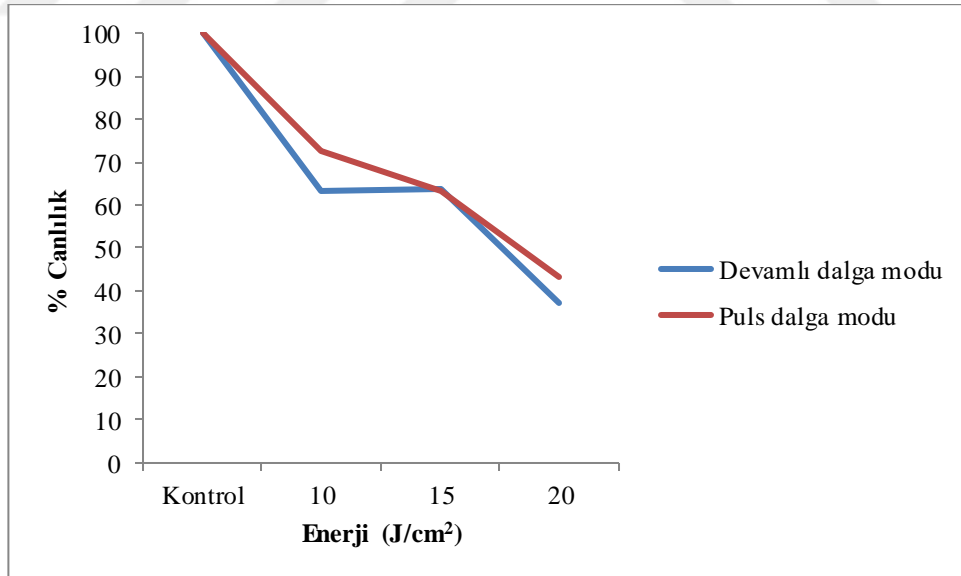
LED ışık kaynağı ile HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde devamlı dalga modu ve puls dalga modu kullanılarak gerçekleştirilen in vitro FDT'nin karşılaştırmalı sonuçları grafikler üzerinde gösterilmiştir.

Analiz sonucuna göre 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT'nin daha sitotoksik özellikler gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları

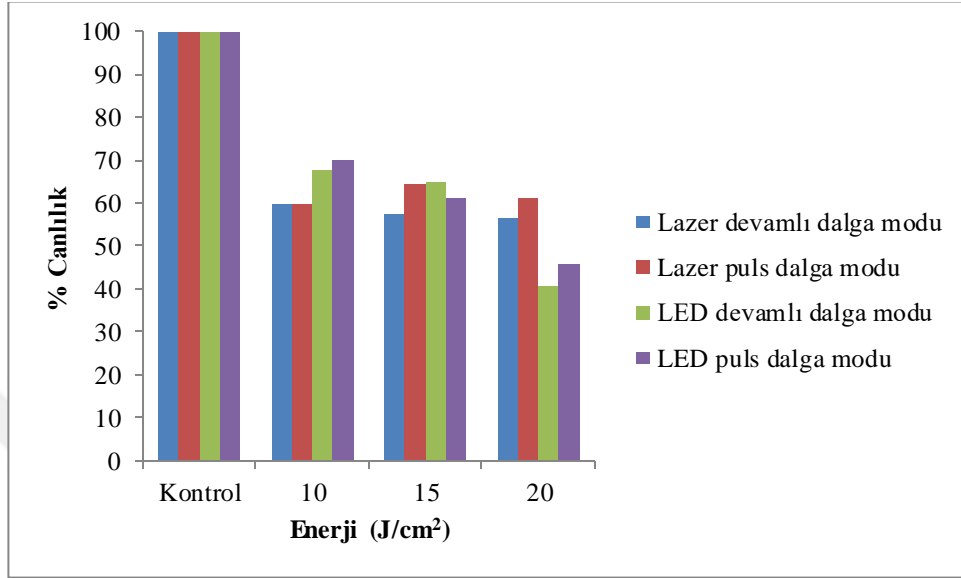
80 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu ile gerçekleştirilen FDT'nin 10 J/cm^2 ve 15 J/cm^2 enerji yoğunluklarında daha sitotoksik özellikler gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.11.).



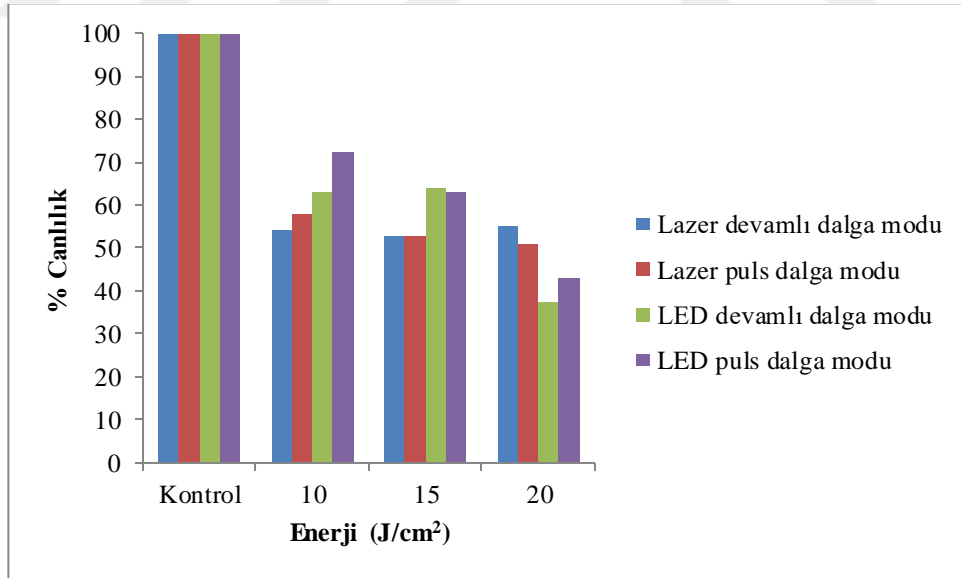
Şekil 4.11. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları

Lazer ve LED kaynaklarında gerçekleştirilen in vitro FDT'de devamlı dalga modunun daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Lazer ışık kaynağı ve her iki dalga modu kullanılarak gerçekleştirilen FDT'de 10 J/cm^2 ve 15 J/cm^2 enerji

yoğunluklarının, LED ışık kaynağı ve her iki dalga modu kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye göre daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12. ve 4.13.).



Şekil 4.12. 40 mW/cm^2 güç yoğunluğunda lazer ve LED tabanlı, devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları



Şekil 4.13. 80 mW/cm^2 güç yoğunluğunda lazer ve LED tabanlı, devamlı ve puls dalga modları kullanılarak gerçekleştirilen FDT'ye ait hücre canlılık sonuçları

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanser, her yıl yaklaşık 1.09 milyon yeni tanı konan ve bu nedenle 551.000 ölümlü önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Küresel olarak kolorektal kanser yükünün %60 oranında artması ve bunun da 2030 yılına kadar yılda 2,2 milyondan fazla yeni vaka ve 1,1 milyon ölümlü sonuçlanması beklenmektedir.

Kolorektal kanserde, etkinliği kanıtlanmış mevcut tedavi modaliteleri binlerce hayatı kurtarıırken tedavinin kısa ve uzun vadeli toksisiteyi genellikle yaşam kalitesini önemli ölçüde tehlikeye atmaktadır. Tedavi etkinliği artırmak ve toksisiteyi azaltmak için yenilikçi araştırmalar yapılmaktadır. Mevcut tedavi rejimleri, hastalar üzerindeki etkiyi azaltmak, tolere edilebilirliği artırmak ve hasta sonuçlarını optimize etmek için modifiye edilmekte ve tedaviler üzerinde yeni şeyler denenmektedir [128].

Fotodinamik terapi, bir bileşimin hedef dokularda uygulanmasını ve tutulmasını içeren ve daha sonra bu bileşiğe uyarıcı olan uygun bir dalga boyunda görünür ışığa maruz bırakılarak etkinleştirilen iki aşamada gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir [128].

Fotodinamik terapi temelde üç şey gerektirir: bir ışığa duyarlılaştırıcı, bir ışık kaynağı ve oksijen. Hedeflenen bir alan üzerine topikal bir ışığa duyarlı hale getirici ajanın uygulanmasını ve ardından ajanın ışık ışınlarıyla etkinleştirilmesini içermektedir. Oksijen varlığında reaktif oksijen ara ürünlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu ara maddeler, geri döndürülemez oksidasyona bağlı olarak temel hücresel bileşenler üzerinde etki ederek apoptoza ve nekroza yol açmaktadır.

Fotodinamik tedavi dermatolojide, genel onkoloji, kardiyovasküler ve oftalmoloji alanlarında kullanılmaktadır. Deri endikasyonları için fotodinamik terapide, genellikle protoporfirin IX'un öncüleri olan 5-aminolevulinik asit veya metil aminolevulinat gibi topikal bir fotoduyarlı maddeler kullanılmaktadır. İç organlarda oluşan tümörlerin tedavisi intravenöz veya oral fotoduyarlı madde kullanılmaktadır ve bu endikasyon için en yaygın kullanılan fotoduyarlı madde porfimer sodyumdur. Porfimer sodyum 630 nm'de (kırmızı) ışığı absorbe ederken ikinci nesil ajanlar daha uzun dalga boylarını absorbe ederek tümörün yok edilmesi için daha fazla enerji sağlamaktadır. Üçüncü nesil ajanlar, tümör antijenlerine, lipozomlara ve fotoduyarlı maddeyi hücreye taşıyan diğer biyomoleküllere yönelik antikolar gibi taşıyıcı moleküller ile veya tümör hücresi yüzeyinde fotoduyarlı maddenin daha seçici birikimine yol açan reseptör-pozitif bölgeler ile konjuge olanlardır. ABD Gıda ve İlaç Dairesi belirli endikasyonlar için yalnızca birkaç fotoduyarlı maddeyi onaylarken Kanada, Japonya ve Hollanda gibi diğer ülkelerde daha geniş onay mevcuttur.

ALA aracılı fotodinamik terapi, kanser tedavisi için fotodinamik terapi araştırmasında en umut verici alanlardan biri olmuştur. 5-aminolevulinik asit, fotosensitize edici Protoporfirin IX'un (PpIX) ön ilacıdır. ALA uygulamasından sonra hücreler, hem biyosentetik yolla PpIX oluşturur. ALA / PpIX seçiciliğinin kesin nedenleri bilinmemekle birlikte, hem enzimlerinin özel regülasyonu nedeniyle, tümörlerde PpIX'in biriktiğine inanılmaktadır. Hem ALA hem de türevi ALA Metil ester esas olarak dermatolojide kullanılmaktadır. Ayrıca ALA aracılı fotodinamik terapi, endoskopik olarak erişilebilir tümörlerin palyatif ve küratif tedavisi için kullanılmıştır. Akciğer, özofagus, mide ve mesane karsinomları ve ayrıca oral premalign lezyonlar, jinekolojik intraepitelyal neoplaziler ve Barrett's özofagusu çoğunlukla ALA aracılı fotodinamik terapi ile tedavi edilen durumlardır. Öte yandan, ALA ile indüklenen PpIX floresansı, Fotodinamik Tanı veya sitoredüktif cerrahide yardım (Floresan kılavuzlu Rezeksiyon, FGR) için kullanılmaktadır. ALA, mesane kanseri tanısında floresan sistoskopi için yüksek dereceli gliomaların tanısı ve ALA Heksil ester için onaylanmıştır. ALA aracılı fotodinamik tanı şu anda beyin, mesane,

akciğer, kolon kanserlerinde uygulanmaktadır. Ayrıca fotodinamik terapi aynı teşhis prosedüründe eş zamanlı olarak uygulanabilmektedir [130].

Fotodinamik terapide lazer, LED, akkor ışık, lazer yayan diyotlar ve gün ışığı gibi çeşitli ışık kaynakları ile gerçekleştirilmiştir. Işık özellikleri ve uygulama şekli, farklı doku türlerini hedeflemek için değiştirilebilmektedir. Örneğin kırmızı ışık, mavi ışıktan daha derine nüfuz eder. İç organlara ve ara yerlere şişirilebilir balonlar, optik fiberler ve diğer araçlarla erişilebilir. Toplam ışık dozu, ışığa maruz kalma süresi ve ışık uygulama modu (toplu olarak dozimetri olarak bilinmektedir) da değiştirilebilmektedir. Geleneksel veya akut FDT (aFDT), kısa bir süre içinde yüksek ışık dozları uygular, bu yöntem optimal olarak seçici değildir ve normal çevre dokuda apoptoz ile sonuçlanır. Geleneksel fotodinamik terapi, hızlı oksijen tükenmesine neden olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu sınırlamaktadır. Oksijen tükenmesini en aza indirmek ve diğer yan etkileri azaltmak için araştırmacılar, fraksiyonasyon, metronomik FDT ve düşük dozlu FDT gibi alternatif ışık dozları üzerinde çalışmaktadırlar. Bu alternatif stratejiler ümit verici sonuçlar gösterse de, henüz yaygın kullanıma sahip değildir [130].

ALA-5, lazer ve LED kaynakları kullanılarak farklı kanser hatları üzerinde in vivo ve in vitro fotodinamik terapi çalışmaları gerçekleştirilmektedir.

Aleksandra Kawczyk-Krupka ve arkadaşları [112] tarafından yapılan çalışmada ALA-5 aracılı fotodinamik terapi etkinliği, kolon kanseri hücrelerinin salgılama aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. 0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM konsantrasyonlarında ALA ve 10 j/cm^2 , 30 j/cm^2 ve 60 j/cm^2 enerji yoğunluklarında, düşük ve yüksek dereceli kolon kanseri hücre hatlarında fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir. İki kanser hattında farklı canlılık sonuçları elde edildiği ve 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda daha yüksek apoptoz yüzdesi görülmüştür.

Tomoya Hatakeyama ve arkadaşları [131] tarafından kolon kanseri hücrelerinde çeşitli LED'ler kullanılarak ALA aracılı fotodinamik terapinin antitümör etkinliği in

vivo ve in vitro olarak incelenmiştir. Mavi (tepe dalga boyu, 456 nm), beyaz (geniş bant) ve kırmızı (635 nm) olmak üzere 3 farklı LED kullanılarak HT-29 kolon kanseri üzerinde ALA-5 aracılı fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir. Fotodinamik terapi uygulamasından 24 saat sonra MTT analizi yapılarak in vitro sitotoksosite çalışması gerçekleştirilmiştir. İn vivo ALA aracılı fotodinamik terapi haftalık aralıklarla 3 kez tekrarlanılarak gerçekleştirilmiş olup, ilk tedaviden üç hafta sonra, farelerin tümörleri çıkarılarak tümör ağırlıkları ölçülmüştür. İn vivo ve in vitro sonuçlar kontroller ile karşılaştırıldığında ALA aracılı fotodinamik terapinin antitümör etkinliği gösterdiği görülmüştür.

Literatürde belirtildiği gibi ALA farklı kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. Ying Mave arkadaşları [132] ALA-5 aracılı fotodinamik terapinin oral skuamöz hücreli karsinom üzerindeki etkisini in vitro olarak gözlemlemişlerdir. ALA-5 aracılı fotodinamik terapi etkinliği sonucu oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin büyümesi üzerinde ilaç dozu ve inkübasyon süresi ile yüksek oranda ilişkili olan inhibitör etkisi yaptığı görülmüştür. Çalışma sonucu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına ALA, oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin apoptozu üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Lazer ışınlaması ile birleştirilmiş ALA-5'in farklı konsantrasyonları apoptoz üzerinde etki gösterdiği ve in vitro olarak hücrelerin büyümesini engellediği görülmüştür.

Kamanlı A. ve arkadaşları [125] tarafından farklı meme kanseri hücre hatlarında LED ve Lazer tabanlı, ALA-5 aracılı fotodinamik terapi çalışması gerçekleştirilmiştir. LED tabanlı yapılan çalışmada zayıf ve agresif meme kanseri hücre hatları üzerinde ALA-5 aracılı fotodinamik terapi etkinliği WST-1, Anneksin V ve farklı enerji seviyelerinde akridin turuncu boyama ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığı LED dozuna bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı, 18 j/cm^2 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluklarında apoptotik hücre yüzdesinde artış görülmüştür. Aynı grup tarafından meme kanseri hücre hatlarında ALA-5 aracılı fotodinamik terapi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada iki farklı ALA dozunun iki farklı meme kanseri üzerindeki terapotik etkileri PpIX floresan birikimi ve WST-1 analizi ile değerlendirilmiştir. Hücreler

farklı dozlarda lazer diyot ile ışınlanmış ve ışınlanmadan sonra ALA-5'in anti kanser etkileri, hücre canlılığı ve hücre ölümü analizleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda 1 mM ALA, lazer dozuna bağlı bir şekilde hücrelerin poliferasyonunu önemli bir şekilde azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediği görülmüştür [133].

Puls dalga modunun devamlı dalga moduna göre fotodinamik terapide tekli oksijen üretimi ve doku reoksijenasyonu bakımından daha etkili olacağını düşünen bilim insanları bunun üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada lazer ışığının puls ve devamlı modu kullanılarak fotodinamik terapideki kümülatif tekli oksijen konsantrasyonu arasındaki farklar teorik olarak hesaplanmıştır. İn vitro deneysel sonuçlarda ise puls mod ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi, devamlı mod ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi ile benzer sitotoksik etkiye sahip olduğu; fakat puls mod ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi esas olarak apoptozu indüklerken devamlı mod ile gerçekleştirilen fotodinamik terapinin nekrotik hücre ölümünü indüklediği görülmüştür [134].

Çalışmamızda 5-ALA fotoduyarlı maddesinin HT-29 kolon kanseri hücre hattında in vitro fotodinamik terapisi yapılmıştır. 635 nm dalga boyuna sahip Lazer ve LED ışık kaynakları kullanılarak iki farklı ışık uygulama modu ile fotodinamik terapi gerçekleştirilmiş olup bu fotodinamik terapinin HT-29 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

Deneysel optimizasyon ve ana çalışma olmak üzere iki başlık altında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında HT-29 kolon kanseri ve WI-38 akciğer fibroblast sağlıklı hücre hattı üzerinde ALA-5'in 3 farklı dozunda ve 6 farklı ışık dozunda sitotoksikite çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonrasında elde edilen verilere göre hücre poliferasyonunu çok fazla etkilemeyen, ALA-5'in ve ışık dozunun toksik etki yapmayacağı konsantrasyonlar seçilmiştir.

ALA-5'in 0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu uygulanmış olup canlılık sonuçları MTT testi ile analiz edilmiştir.

HT-29 kolon kanseri hücre hattında 0,5 mM'lık konsantrasyonda canlılık %92,48, 1 mM'lık konsantrasyonda canlılık %92,34 ve 1,5 mM'lık konsantrasyonda ise canlılık % 90,80 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre 1 mM'lık konsantrasyonda canlılık oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çözeltinin molarını yükselterek canlılık oranını düşürebileceğimizi bu sonuçlardan anlıyoruz fakat çözeltinin yoğunluğunun hücrelere zarar verebileceği de düşünüldüğü için daha yoğun oranlarda kullanılmamıştır. HT-29 kolon kanseri hücre hattında canlılık üzerine toksik etki göstermeyen ALA-5 konsantrasyonu 1mM olarak belirlenmiştir ve ana deneylerde 1 mM'lık ALA-5 konsantrasyonu kullanılmıştır.

Kontrol olarak WI-38 normal insan akciğer fibroblastı hücre hattında 0,5 mM'lık konsantrasyonda canlılık %98,27, 1 mM'lık konsantrasyonda %94,21 ve 1,5 mM'lık konsantrasyonda canlılık %96,05 olarak belirlenmiştir. Sağlıklı hücre hattında canlılık oranı hücre hatları arası büyük farklılık göstermemiştir.

Optimizasyon çalışmasının diğer basamağı olan ışık dozunda 6 farklı enerji yoğunlukları ile sitotoksikite çalışması gerçekleştirilmiştir. 5 j/cm^2 , 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 , 20 j/cm^2 , 25 j/cm^2 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluklarında lazer ve LED uygulamaları gerçekleştirilmiş olup XTT testi ile analiz edilmiştir.

Lazer grubunda yapılan ışık dozu çalışmasında HT-29 kolon kanseri hücre hattında 5 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %96,59, 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %91,15, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %95,66, 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %93,36, 25 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %94,90 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %94,04 olarak belirlenmiştir.

LED grubunda yapılan ışık dozu çalışmasında HT-29 kolon kanseri hücre hattında 5 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %95,73, 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %95,35, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %95,90, 20 j/cm^2 enerji

yoğunluğunda canlılık %93,36, 25 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %93,80 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %89,98 olarak belirlenmiştir.

Kontrol olarak WI-38 normal insan akciğer fibroblastı hücre hattının lazer grubunda yapılan ışık dozu çalışmasında 5 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %100,25, 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %100,32, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %101,51, 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %99,31, 25 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %96,21 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %99,06 olarak belirlenmiştir.

WI-38 normal insan akciğer fibroblastı hücre hattının LED grubunda yapılan ışık dozu çalışmasında 5 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %99,57, 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %99,68, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %97,84, 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %94,77, 25 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %101,26 ve 30 j/cm^2 enerji yoğunluğunda canlılık %99,12 olarak belirlenmiştir.

Yapılan ışık dozu çalışmalarında ana deney çalışmaları için 10 j/cm^2 , 15 j/cm^2 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunlukları belirlenmiştir. Bu değerler her grup için tek tek analiz edilmiş ve karşılaştırmalarını yaptıktan sonra karar verilmiştir.

Literatürde de belirtilen fotodinamik terapi 3 önemli bileşenin varlığı ve bu bileşenlerin bir araya gelince oluşturduğu etkileşim önemlidir. Bu bileşenler tek başına toksik olmayıp bir araya geldiğinde kanserli hücrelerde ölümcül bir etki yapması beklenmektedir [80]. Elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman ALA-5'in ve ışık dozunun hücreler üzerinde tek başına toksik etki yapmadığı literatürdeki çalışmalarla örtüşmektedir (Tablo 2.9.). Bu manada yapılan optimizasyon çalışması sonucu elde edilen verilere göre 1 mM ALA-5 dozu ve 10 J/cm^2 , 15 J/cm^2 ve 20 J/cm^2 ışık dozları seçilerek fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir.

Ana deney çalışmaları lazer ve LED ışık kaynaklarıyla iki farklı dalga modu ve üç farklı enerji yoğunluğu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Lazer ve LED grubu şeklinde fotodinamik terapi uygulamaları gerçekleştirilmiş olup devamlı ve puls dalga modu grupları oluşturularak ana deney çalışması gerçekleştirilmiştir. Tüm deney gruplarında 1 mM ALA-5'in 4 saatlik inkübasyonunu takiben fotodinamik terapi uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Fotodinamik terapi uygulamalarından 24 saat sonra XTT testi ile hücre canlılığı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Lazer grubunun devamlı ve puls dalga modu kullanılarak HT-29 hücreleri üzerinde fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir.

Lazer grubunda 40 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %59,81, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %57,66 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %56,71 canlılık gözlemlenmiştir.

80 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %54,06, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %52,84 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %55,12 canlılık gözlemlenmiştir.

40 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve puls dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %59,94, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %64,29 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %61,02 canlılık gözlemlenmiştir.

80 mW/cm^2 güç yoğunluğu ve puls dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %58,04, 15 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %52,81 ve 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %50,96 canlılık gözlemlenmiştir.

Devamlı dalga modu HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası canlılık değerinin en fazla olduğu 10 j/cm^2 enerji yoğunluğunda %59,81'dir. Puls dalga

modu HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası canlılık değerinin en fazla olduğu $15 J/cm^2$ enerji yoğunluğunda %64,29'dur.

LED grubunun devamlı ve puls dalga modu kullanılarak HT-29 hücreleri üzerinde fotodinamik terapi gerçekleştirilmiştir.

$40 mW/cm^2$ güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası $10 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %67,50, $15 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %64,59 ve $20 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %40,74 canlılık gözlemlenmiştir.

$80 mW/cm^2$ güç yoğunluğu ve devamlı dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası $10 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %63,22, $15 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %63,74 ve $20 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %37,30 canlılık gözlemlenmiştir.

$40 mW/cm^2$ güç yoğunluğu ve puls dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası $10 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %69,97, $15 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %61,25 ve $20 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %45,89 canlılık gözlemlenmiştir.

$80 mW/cm^2$ güç yoğunluğu ve puls dalga modu kullanılan HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası $10 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %72,37, $15 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %63,22 ve $20 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %43,18 canlılık gözlemlenmiştir.

Devamlı dalga modu HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası canlılık değerinin en fazla olduğu $10 j/cm^2$ enerji yoğunluğunda %67, 50'. Puls dalga modu HT-29 kolon kanseri hücrelerinin XTT analizi sonrası canlılık değerinin en fazla olduğu $10 J/cm^2$ enerji yoğunluğunda %69,97'dir.

Elde edilen bulgulara göre kullanılan ışık kaynaklarının, ışık dozlarının, farklı dalga modlarının, güç yoğunluğu ile ilişkili tedavi süresi gibi parametreler fotodinamik terapi üzerinde çok etkili olduğu görülmüştür. Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi sonuçlar incelendiğinde HT-29 kolon kanseri hücre hattının canlılığı, devamlı dalga modu kullanılarak maruz kalınan ışık dozlarının artmasıyla azaldığı gözlemlenmiştir.

Fotodinamik terapide devamlı ve puls dalga modlarının etkinliği araştırılmaktadır. Bir grup bilim insanının hematorporfirin türevi fotoduyarlı maddesi ile yaptığı bir çalışmada puls dalga modunun apoptozu indüklediğini, devamlı dalga modunun nekroza yol açtığı ve daha sitotoksik olduğunu belirtmişlerdir. Fotoduyarlı maddeler kullanılarak yapılan fotodinamik terapi için devamlı ve puls dalga modunun karşılaştırılabilir etkinliğinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra bir grup araştırmacılar puls dalga modu kullanılarak gerçekleştirilen fotodinamik terapi etkinliğinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Devamlı dalga ışınlamasından sonra dokularda lokal ısınma ve termal hasar görülme riski bulunmaktadır. Çalışmaların in vivo aşamasında sağlıklı dokulara hasar vermemek adına puls dalga modlu fotodinamik terapi kullanılması önerilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan ışık kaynakları, ışık kaynaklarının dalga doyu ve modu, enerji yoğunluğu ve ışık dozu, kullanılan fotoduyarlı madde, fotoduyarlı maddenin dozu ve hücresele lokalizasyonu gibi parametreler fotodinamik terapinin birbirinden farklı sonuçlarını meydana getirmektedir.

Elde ettiğimiz çalışma sonuçlarına bakıldığında kullanılan ışık kaynağı, ışık dozu, dalga modu, fotoduyarlı madde ve dozu gibi parametrelerin fotodinamik terapi sonrası meydana gelen sitotoksiteyi etkilediği görülmüştür. LED ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi, lazer ile gerçekleştirilen fotodinamik terapiye kıyasla daha fazla sitotoksik etki bıraktığı gözlemlenmiştir. Devamlı dalga modu ile ışınlanan hücreler puls dalga modu ile ışınlanan hücrelere daha fazla sitotoksik olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Bu tez çalışması kolon kanserine yönelik fotodinamik terapi uygulamalarını laboratuvarında otomatize eden LED ve lazer sistemleri kullanılarak tedavi etkinliğinin artmasını sağlayacak protokol ile literatüre katkı sağlanması beklenmektedir. Yapılan tez çalışmasında otomatik konumlama ve doz kontrollü LED sistemi ve halihazırda var olan lazer cihazı ile devamlı ve puls dalga modları kullanılarak ALA-5 fotoduyarlı maddesinin kolon kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmayla HT-29 kolon kanserine özel optik karakterizasyon ile tedavinin hedeflenmesi bu çalışmayı özgün kılmaktadır.

Yapılan çalışma sonucu 10 j/cm^2 ve 15 j/cm^2 enerji yoğunluklarında lazer sistemi ile yapılan fotodinamik terapinin daha sitotoksik özellikler gösterdiği 20 j/cm^2 enerji yoğunluğunda ise LED sistemi ile yapılan fotodinamik terapinin daha sitotoksik özellikler gösterdiği görülmüştür. Devamlı ve puls dalga modları ile gerçekleştirilen fotodinamik terapide devamlı modun puls dalga moduna göre daha fazla sitotoksik olduğu sonucu çıkmıştır.

Sonuç olarak *in vitro* koşullar altında gerçekleştirilen bu deneyin gelecek çalışmalarda kolon kanseri için lazer ve LED sistemlerinin kullanılabilirliğini göstermiştir. Bir sonraki çalışmalarda bu iki sistemi daha iyi karşılaştırma adına apoptoz ve nekroz ölüm oranları belirlenmelidir. Bu sayede yüksek apoptoz oranı gösteren ve bu manada tedavi etkinliğini en iyi kanıtlayan dozları bularak çalışmanın *in vivo* koşullar altında da gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Alim, E.N., Türkiye’de ve Dünyada Kanser Epidemiyolojisi. T.C.Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü.
- [2] Colorectal Cancer. International agency for Research on Cancer, Globocan 2018.
- [3] Reisoğlu H., Kanserle Dans. Kanserle Dans Derneği Yayınları, Eylül, 2013.
- [4] Asyalı M.H., Kara, S., Yılmaz, B., Biyomedikal Mühendisliğinin Temelleri. 1.Basım, Nobel Yayınları, 1-34, 2014.
- [5] Arapgirlioğlu, H., Atik, A., Hızıroğlu, S., Elliott, L.R., Atik, D., The most recent studies in science and art. İçinde: Chapter 93 Photodynamic Therapy. Vol 2, Ankara, 2018.
- [6] R, S. R., Kotha, R., Tatapudi, R., Gudapati, S., Madhavai, S., Kiran, S., Photo Dynamic Therapy in Oral Diseases. International Journal of Biological & Medical Research, Vol 3, 1875–1883, 2012.
- [7] Kübler, A.C., Photodynamic therapy. Medical Laser Application 20, 37–45, 2005.
- [8] Craig, R. A., Mccoy, C. P., Gorman, S. P. & Jones, D.S., Photosensitisers- the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. Expert Opinion on Drug Delivery, Vol 12, 1–17, 2015.
- [9] Kemal, M.R., Ak, A., Gülsoy, M., Therapy Dose-dependent photochemical/ photothermal toxicity of indocyanine green-based therapy on three different cancer cell lines. Photodiagnosis and Photodynamic 21, 334–343, 2018.
- [10] Mühleisen, L. Alev, M., Unterweger, H., Subatzus, D., Pöttler, M., Friedrich, R.P., Alexiou, C., Janko, C., Analysis of Hypericin-Mediated Effects and Implications for Targeted Photodynamic Therapy, 2017.
- [11] Hall, J.E., Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. İçinde: Propulsion and Mixing of Food in the Alimentary Tract. Saunders Elsvier, 12. Basım, 2011.

- [12] DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A., DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer Principles & Practice of Oncology. İçinde: Chapter 61-62. 11. Basım, Wolters Kluwer, 2019.
- [13] Moore, K.L., Dalley, F.A., Agur, A.M.R., Moore Clinically Oriented Anatomy. İçinde: 2 Abdomen, 7.Baskı, Wolter kluwer, 2014.
- [14] Standring, S., Gray's Anatomy. İçinde: Abdomen and pelvis. 41. Basım, Elsevir, 2016.
- [15] Mahadevan, V., Anatomy of the caecum , appendix and colon. Surgery 35, 115–120, 2017.
- [16] Marcio, J., Jorge, N., Habr-gama, A., Wolff B.G. et al. (eds) The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery. İçinde: Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus. Springer, New York, NY, 2007.
- [17] Hagihara, P.F., Griffen, W.O., Physiology of the Colon and Rectum. Surgical Clinics of North America (Sempozyum), Vol 52, 1972.
- [18] <https://drahmetdobrucali.com/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/> (Erişim Tarihi 10.12.2020).
- [19] Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, P.A., Cerrada, E., Yoldi Rodriguez, M.J., Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. International Journal of Molecular Science, 2017.
- [20] Naghavi, M., The Global Burden of Cancer 2013. JAMA Oncology, 505-527, 2015.
- [21] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Global Cancer Statistics. A Cancer Journal for Clinicians, Vol 65, 87-108, 2015.
- [22] Kara, F., Keskinılıç, B., Türkiye Kanser İstatistikleri 2016, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, 2018.
- [23] Cheng, Lee, Eng, C., Nieman, L.Z., Kapadia, A.S., Du, X.L., Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the united states from 1976 to 2005. American Journal of Clinical Oncology Vol 34, 2011.
- [24] Thanikachalam, K., Khan, G., Colorectal Cancer and Nutrition. Nutrients, 2019.
- [25] Arnold, M. Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. BMJ, 683–691, 2017.

- [26] Bettington, M., Walker N., Clouston, A., Brown, I., Legget, B., Whithall, V., The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 367–386, 2013.
- [27] Hanahan, D., Weinberg, R.A., Francisco, S., The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol 100, 57–70, 2000.
- [28] Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, Vol 144, 646–674, 2011.
- [29] Little, M., Vineis, P., A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. *Journal of Theoretical Biology*, Vol 254, 229–238, 2008.
- [30] Fearon, E.F., Vogelstein, B., A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767, 1990.
- [31] Vogelstein, B., Kinzler, T.W., The multistep nature of cancer. *TIG* Vol 9, 3–6, 1993.
- [32] Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Genetic instabilities in human cancers. *Nature* Vol 396, 643–649, 1998.
- [33] Grady, W., Carethers, M.J., Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *NIH* Vol 135, 1079–1099, 2010.
- [34] Pino, M.S., Chung, D.C., Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 5(3), 385–399, 2011.
- [35] Powell, M.S., Zilz, N., Barclay, B.Y., Bryan, M.T., Hamilton, R.S., Thibodeau, N.S., Vogelstein, B., Kinzler, W.K., APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 1992.
- [36] Cottrell S., Bicknell, D., Kaklamanis, L., Bodmer, F.W., Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *The Lancet* Vol 340, 626–630, 1992.
- [37] Pessot, F. Le, Tougeron, D., Maby, P., Elie, N., Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *Plos one* Vol 8, 14–18, 2013.
- [38] Tian, S., Simon Í., Moreno, V., Roepman, P., Tabernero, J., Snel, M., van't Veer, L., Salazar, R., Bernards, R., Capella, G., A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut* 540–549, 2013.
- [39] Bedeir, A., Krasinskas, A M., Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med* Vol 135, 2011.

- [40] Heitzer, E., Tomlinson, I., Replicative DNA polymerase mutations in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Vol 24, 107–113, 2014.
- [41] Lynch, H.T., Lanspa, S., Smyrki T., Boman, B., Watson, P., Lynch, J., Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndromes I & II) Genetics , Pathology , Natural History , and Cancer Control , Part I. *Cancer Genet Cytogene* Vol 53, 143–160, 1991.
- [42] Teodoridis, J. M., Hardie, C., Brown, R., CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer : Causes and implications. *Cancer Letters* Vol 268, 177–186, 2008.
- [43] Wheeler, J.MD., Bodmer, W.F., DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*, 148–153, 2000.
- [44] Thrift, A.P., Gong, J., Peters, U., Claudi, C.J., Rudolph, A., Slattery, L.M., Chan, T.A., Kahall, B., Justice, E.A., Pers, M.L., Gallinger, S., Hayes, B.S., Baron, A.J., Caan, J.B., Ogino, S., Berndt, S., Chanock, J.S., Casey, G., Halle, W.R., Du, M., Harrison, A.T., Thornquist, M., Duggan, J.D., Marchand, L.L., Lindor, N.M., Seminara, D., Song, M., Wu, K., Thibodeau, N.S., Cotterchio, M., Win, K.A., Jenkis, A.M., Hoffmeister, M., Brenner, H., White, E., Hsu, L., Campbell, P., Mendelian randomization study of body mass index and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2015.
- [45] WCRF& AICR. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR; 2007.
- [46] Langhorne, E.M., Fulton, J.S., Otto, S.E., *Oncology Nursing*, 5.Basım, Mosby, 2007.
- [47] Labianca, R., Beretta D.G., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, A.M., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., Braud, F., Wils, J., Colon cancer. *Crit. Rev. Oncology Hematology* vol 74, 106–133, 2010.
- [48] Tarhan, R.Ö., Kolon ve Rektum Kanseri Tüm Makale Kolon ve Rektum Kanseri (Kolorektal Adenokanser).
- [49] PDQ Adult Treatment Editorial Board, Colon Cancer Treatment (PDQ ®), 2020.
- [50] <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating.html> (Erişim Tarihi 10.12.2020).
- [51] Tong, G., Zhang, G., Liu, J., Zheng, Z., Chen, Y., Cui, E., A meta-analysis of short-term outcome of laparoscopic surgery versus conventional open surgery on colorectal carcinoma. *Medicine* Vol 48, 2017.
- [52] Rouh, G.T., Marko, C., Thalhammer, A., Eldin, N., Langenbach, M., Beeres, M., Naguib, N.N., Zangos, S., Vogl, J.T., Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases. *British Institute of Radiology*, 2016.

- [53] Boas, F.E., Bodei, L., Sofocleous, C T., Radioembolization of Colorectal Liver Metastases: Indications, Technique, and Outcomes. *The Journal of Nuclear Medicine* Vol 58, 104–112, 2017.
- [54] Haddock, M.G., Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review. *Radiation Oncology*, 1–8, 2017.
- [55] Häfner, M.F., Debus, J., Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. *Visceral Medicine*, 172–17, 2016.
- [56] Tam, S.Y., Wu, Vincent, W.C., A Review on the Special Radiotherapy Techniques of Colorectal Cancer. *Frontiers in pncology*, 1–9, 2019.
- [57] Wolpin, B.M., Mayer, R J., Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 1296–1310, 2008.
- [58] Lombardi, L., Morelli F., Cinieri, S., Santini, D., Silvestris, N., Fazio, N., Orlando, L., Colucci, G., Maiello, E., Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. *Cancer Treatment Reviews*, 34–41, 2010.
- [59] Wright, M., Beaty, S.J., Ternent, A.C., Molecular markers for colorectal cancer. *Surgical Clinics*, Vol 97, 683–701, 2019.
- [60] Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, R.P., Büchler, W.M., Colorectal cancer. *Lancet*, 153–65, 2005.
- [61] Benson A.B., Venook A.P., Al-Hawary M.M., Cederquist L., Chen Y.J., Ciombor K.K., Cohen S., Cooper H.S., Deming D., Engstrom P.F., Garrido-Laguna I., Grem J.L., Grothey A., Hochster H.S., Hoffe S., Hunt S., Kamel A., Kirilcuk N., Krishnamurthi S., Messersmith W.A., Meyerhardt J., Miller E.D., Mulcahy M.F., Murphy J.D., Nurkin S., Saltz L., Sharma S., Shibata D. Skibber J.M., Sofocleous C.T., Stoffel E.M., Stotsky-Himelfarb E., Willett C.G., Wuthrick E., Gregory K.M., Freedman-Cass D.A., NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw*. 16(4):359-369, Nisan, 2018.
- [62] Russo, M., Siravegna, G., Blaszowsky, S.L., Corti, G., Crisafulli, G., Ahronian, G.L., Mussolin, B., Kwak, L.E., Buscarino, M., Lazzari, L., Valtorta, E., Truini, M., Jessop, A.N., Robinson, E.H., Hong, S.T., Kenudson, M.M, Nicolantonio, F., Thabet, A., Bianchi, S.A., Siena, S., lafrate, J.A., Bardelli, A., Corcoran, B.R., Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer. *American Association for Cancer Research*, 47-154, 2016.
- [63] Fernando, H.N., Hurwitz, I.H., Targeted Therapy of Colorectal Cancer: Clinical Experience with Bevacizumab. *The Oncologist*, 11–18, 2004.

- [64] Siena, S., Sartore-bianchi, A., Nicolantonio, F. Di, Balfour, J. & Bardelli, A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor – Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *JNC*, Vol 101, 2009.
- [65] Riley, J.M., Cross, W.A., Paulos, M.C., Rubinstein, P.M., Wrangle, J., Ramsey, E., The Clinical Implications of Immunogenomics in Colorectal Cancer: A Path for Precision Medicine. *Cancer*, 2018.
- [66] Koido, S., Ohkusa, T., Komma, S., Namiki, Y., Takakura, K., Saito, K., Ito, Z., Kobayashi, H., Kajihara, M.i Arihiro, S., Arakawa, H., Okamoto, M., Gong, J., Tajiri, H., Immunotherapy for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, Vol 19, 8531-8542, 2013.
- [67] Richter, K.M., M., Krupka, K.A., Aebisher, D., Aebisher, B.D., Czuba, Z., Cieslar, G., The capability and potential of new forms of personalized colon cancer treatment: Immunotherapy and Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol 25, 253-258, 2019.
- [68] Abdel-kader, M.H., *Photodynamic Therapy*. Springer, 2014.
- [69] Ito, Y., *Photochemistry for Biomedical Applications*. Springer, 2018.
- [70] Dougherty, T.J., Kaufman, E.J., Goldfarb, A., Weishaupt, R.K., Boyle, D., Mittleman, A., Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Research* 38, 2628-2635, 1978.
- [71] Dougherty T.J., A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *J Clin Laser Med Surg.*, 14(5) :219-21, 1996.
- [72] Dougherty, T. , Schwartz, S., Photodynamic therapy for cancer skin of mice. *Nature*, Vol 3, 380-387, 2003.
- [73] Fayter, D., Corbett, M., Heirs, M. , Fox, D., Eastwood, A., A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre- cancerous skin conditions , Barrett ' s oesophagus and cancers of the biliary. *Health Technology Assessment*, Vol 14, 2010.
- [74] Kennedy, J., Pottier, H.R., Pross, C.D, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin ix: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Vol 6, 143-148, 1990.
- [75] Ormrod, D., Jarvis, B., Topical aminolevulinic acid hcl photodynamic therapy. *Am J Clin Dermatol*, 133-139, 2000.
- [76] Reginato, E., Induction of immunological changes induced by photodynamic therapy (PDT) for cancer. Medical University of Graz Department of Dermatology. 2014, Doktora Tezi.

- [77] Fitzgerald, F., Photodynamic Therapy. İçinden: Basic mechanism, applications and functional nanomaterial-based drug delivery system for cancer. Nova biomedical, New York, 2017.
- [78] Bonavida, B., Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics. Springer-Verlag New York, Vol 5, 2015.
- [79] Rahman, T., Hosen, I., Islam, M.M.T., Shekhar, H.U., Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol 3, 997-1019, 2012.
- [80] Chandran, R., Denis, G.T., Vecchio, D., Avcı, P., Sadasivam, M., Hamblin, M., Photodynamic therapy. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol 4, 413-467, 2015.
- [81] Robertson, C. A., Evans, D.H., Abrahamse, H.E., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol 96, 1-8, 2009.
- [82] Oniszczyk, A., Wojtunik-kulesza, K.A., Oniszczyk, T., Kasprzak, K., The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine Pharmacotherapy*, Vol 83, 912-929, 2016.
- [83] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, A.K., Foster, H.T., Girotti, W.A., Gollnick, O.S., Korbek, M., Moan, J., Mroz P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, C.B., Golab, J., Photodynamic therapy of cancer: an update. *NIH Public*, 250-281, 2012.
- [84] Ortel, B., Shea, R.C., Pinton, C.P., Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in Bioscience* 14, 4157-4172, 2009.
- [85] Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 86-107, 2007.
- [86] Kessel, D., Oleinick, N.L., Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochemistry and Photobiology*, Vol 94, 213-218, 2018.
- [87] Yoo, J., Ha, K., New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. *International Review Of Cell and Molecular Biology*, Vol 295, 2012.
- [88] Abrahamse, H., Hamblin, M.R., New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.*, 347-364, 2016.
- [89] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., Hamblin, M.R., Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, Vol 3, 2516-2539, 2011.

- [90] Pottier, R., Krammer, B., Baumgartner, R., Stepp, H., Photodynamic Therapy with ALA. *Photochemistry and Photobiology*, Vol 6, 2007.
- [91] Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabriysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., Bojarczuk, K., Golab, J., Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*, Vol 16, 4140-4164, 2011.
- [92] Knap, B., Knap, B., Pryzstowski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Czop, K.K., Kotlinska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka., Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol 106, 1098-1107, 2018.
- [93] Anand, S., Ortel, B.J., Pereira, S.P., Hasan, T., Maytin, E.V., Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Letters*, Vol 326, 8-16, 2012.
- [94] Nokes, B., Apel, M., Jones, C., Brown, G. & Lang, J. E. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *Journal of surgical research*, Vol 181, 262-271, 2013.
- [95] Inoue, K., 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *International Journal of Urology*, Vol 24, 97-101, 2017.
- [96] Ishizuka, M., Abe, F., Sano, Y., Takahashi, K., Inoue, K., Nakajima, M., Kohda, T., Komatsu, N., Ogura, S.I., Tanaka, T., Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *International Immunopharmacology*, Vol 11, 358-365, 2011.
- [97] Valentine, R.M., Ibbotson, S.H., Wood, K., Moseley, H., Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol 12, 203-213, 2013.
- [98] Reinhold, U., Dirschka, T., Ostendorf, R., Aschoff, R., Berking C., Philipp-Dormston, W.G., Hahn, S., Lau, K., Jager, A., Schmitz, B., Lubbert H., Szeimies, R.M., A randomized , double-blind , phase III , multicentre study to evaluate the safety and efficacy of BF-200 ALA (Ameluz) vs . placebo in the field-directed treatment of mild-to- moderate actinic keratosis with photodynamic therapy (PDT) when using the BF-RhodoLED â lamp. *British Journal of Dermatology*, 696–705, 2016.
- [99] Piacquadio J.D, Chen, M.D., Farber, F.H., Fowler, F.J., Glazer, D.S., Goodman, J., Hruza, L.L., Jeffes, W.E., Ling, R.M., Phillips, J.T., Rallis, M.T., Scher, K.R., Taylor R.C., Weinstein, D.G., Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp. *Arch Dermatol*, Vol 140, 2004.

- [100] Moan, J., Iani, V., Ma, L., Choice of the proper wavelength for photochemotherapy. SPIE, Vol 2625, 544-549, 1989.
- [101] Malik, Z., Lugaci, H., Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. Br. J. Cancer, Vol 56, 589-595, 1987.
- [102] Gomer, C. J., Doiron, D. R., Jester, J. V., Szirth, B. C. & Murphree, A. L. Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy for the treatment of intraocular tumors: examination of acute normal ocular tissue toxicity. Cancer Res. 43, 721-727, 1983.
- [103] Krammer, B., Plaetzer, K., Krammer, B., ALA and its clinical impact, from bench to bedside. Photochemical & Photobiological Sciences, 283-289, 2008.
- [104] Shi, L., Buchner, A., Pohla, H., Pongratz, T., Rühm, A., Zimmermann, W., Gederaas, A.O., Zhang, L., Wang, X., Stepp, H., Sroka, R., Methadone enhances the effectiveness of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for squamous cell carcinoma and glioblastoma in vitro.
- [105] Wawrzyniec, K., Kawczyk-krupka, A., Czuba, Z.P., The influence of ALA-mediated photodynamic therapy on secretion of selected growth factors by colon cancer cells in hypoxia-like environment in vitro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Vol 12, 598-611, 2015.
- [106] Golding, J.P., Symonds, K.G.J., Dobson, M.J., Glycolysis inhibition improves photodynamic therapy response rates for equine sarcoids. Veterinary and Comparative Oncology, 1543-1552, 2017.
- [107] Kawczyk-krupka, A., Czuba, Z., Latos, W., Wasilewska, K., Verwanger, T., Krammer, B., Sieroń, A., Influence of ALA-mediated photodynamic therapy on secretion of interleukins 6, 8 and 10 by colon cancer cells in vitro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Vol 22, 137-139, 2018.
- [108] Gederaas, O.A., Rasch, M.H., Berg, K., Lagerberg, J W.M., Dubbelman, T.M.A.R., Photodynamically induced effects in colon carcinoma cells (WiDr) by endogenous photosensitizers generated by incubation with 5-aminolaevulinic acid. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Vol 49, 162-170, 1999.
- [109] Kawczyk-krupka, A., Bugaj, A.M., Latos, W., Wawrzyniec, K., Oleś, P., Mertas, A., Czuba, Z., Król, W., Stoltny, S.K., Sieroń, A., ALA-mediated photodynamic effect on apoptosis induction, and secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and of monocyte chemotactic protein (MCP-1), by colon cancer cells in normoxia and in hypoxia-like conditions in vitro. Photodiagnosis Photodynamic Therapy, 2014.

- [110] Krupka, K.A., Czuba, Z., Kwiatek, S., Krupka, M., Sieroń, A., The effect of ALA-PDT under normoxia and cobalt chloride (CoCl₂)-induced hypoxia on adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) secretion by colorectal cancer cells. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 2017.
- [111] Krupka, K.A., Stoltny, S.K., Latos, W., Czuba, Z.P., Kwiatek, B., Potempa, M., Wasilewska, K., Krol, W., Stanek, A., ALA-induced photodynamic effect on vitality, apoptosis, and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by colon cancer cells in normoxic environment in vitro. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 2015.
- [112] Kawczyk-krupka, A., Kwiatek, B., Czuba, Z., Mertas, A., Latos, W., Verwanger, T., Krammer, B., Sieron, A., Secretion of the angiogenic factor VEGF after photodynamic therapy with ALA under hypoxia-like conditions in colon cancer cells. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 2017.
- [113] Kawczyk-Krupka, A., Latos, W., Oleś, P., Czuba, P.Z., Latos, M., Krupka, M., Pengyun, H., Xu, C., Cieślak, G., Sieroń, A., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy The influence of 5-aminolevulinic photodynamic therapy on colon cancer cell interleukin secretion in hypoxia-like condition in vitro. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 240-243, 2018.
- [114] Wozniak, M., Szachniewicz, D.K., Ziolkowski, P., Insulin-like growth factor-2 is induced following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in sw620 human colon cancer cell line. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol 16, 23615-23629, 2015.
- [115] Chelakkot, V.S., Som, J., Yoshioka, E., Rice, P.C., Rutihinda, S.G., Hirasawa, K., Systemic MEK inhibition enhances the efficacy of 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 2019.
- [116] Postiglione, I., Barra, F., Aloj, S.M., Palumbo, G., Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: unravelling roles of p53 and ABCG2. *Cell Proliferation*, 523-538, 2016.
- [117] Ding, H., Wang, X., Wang, H. & Huang, Z. Successful treatment of refractory facial acne using repeat short-cycle ALA-PDT: Case study. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, Vol 8, 343-346, 2011.
- [118] Tao, S., Li, F., Cao, L., Xia, R., Fan, H., Fan, Y., sun, H., Jing, C., Yang, L., Low-dose topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of different severity of acne vulgaris. *Cell Biochem. Biophys.*, Vol 73, 701-706, 2015.
- [119] Dong, Y., Zhou, G., Chen, J., Shen, L., Jianxin, Z., Xu, Q., Zhu, Y., A new LED device used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris. *Photodiagnosis Photodynamic. Therapy*, Vol 13, 188-195, 2016.

- [120] Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., Kiesslich, T., Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, Vol 24, 259-268, 2009.
- [121] Dobson, J., de Queiroz, G.F., Golding, J.P., Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal* 233, 8-18, 2018.
- [122] Wilson, B.C., Patterson, M.S., The physics , biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics In Medicine And Biology*, Vol 53, 61-109, 2008.
- [123] Mang, T.S., Lasers and light sources for PDT: past , present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 43-48, 2004.
- [124] Furkan, A., Zahid, M., Arslan, H., Çetinel, G., Kenan, N., Lim, H.S., Development of a new multi-mode NIR laser system for photodynamic therapy. *Optics and Laser Technology*, Vol 128, 2020.
- [125] Kamanlı, A.F., Yıldız, M.Z., Özyol E., Ozkan, D.A., Küçükbara, S.E., Eskiler, G.G., Investigation of LED-based photodynamic therapy efficiency on breast cancer cells. *Laser in Medical Science*, 2020.
- [126] Gautam, G., General principles of MTT assay method. 2018.
- [127] https://www.lgestandards-atcc.org/products/all/30-1011K.aspx?geo_country=tr#documentation (Erişim Tarihi 10.12.2020).
- [128] Chakrabarti, S., Peterson, C.Y., Sriram, D., Mahipal, A., Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 808-832, 2020.
- [129] Casas, A., Clinical uses of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic treatment and photodetection of cancer: A review. *Cancer Letters*, 2020.
- [130] Yanovsky, R. L., Bartenstein, D. W., Rogers, G. S., Isakoff, S.J., Chen, S.T., Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, vol 35, 295-303, 2019.
- [131] Hatakeyama, T., Murayama, Y., Komatsu, S. & Shiozaki, A. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology Reports*, vol 29, 911-916, 2013.
- [132] Ma, Y., Qu, S., Xu, L., Lu, H. & Li, B. An in vitro study of the effect of 5-ALA- mediated photodynamic therapy on oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*, 2020.

- [133] Eskiler, G.G., Deveci, Ö. A., Sozen, K.E., Kamanlı, F.A., Gunoğlu, B., Yıldız, M.Z., Optimization of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy protocol for breast cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol 31, 1-7, 2020.
- [134] Klimenko, V., Knyazev, N., Moissenko, F., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, Vol 13, 101-107, 2016.



